

**PENGARUH PEMBERIAN *EPIGALLOCATECHIN GALLATE* TEH  
HIJAU TERHADAP RESPON ALERGI MENCIT BALB/c YANG  
DISENSITISASI DENGAN OVALBUMIN**



**TESIS**

**Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan guna  
memperoleh derajat sarjana S2 Magister Ilmu Biomedik  
Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro**

Oleh

**Diana Nurhayati**

**NIM G4A0 00 004**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2003**

**UPT-PUSTAK-UNDIP**

## TESIS

# PENGARUH PEMBERIAN *EPIGALLOCATECHIN GALLATE* TEH HIJAU TERHADAP RESPON ALERGI MENCIT BALB/c YANG DISENSITISASI DENGAN OVALBUMIN

Disusun oleh

**Diana Nurhayati**  
**G4A000004**

telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
pada tanggal 25 Juni 2003  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

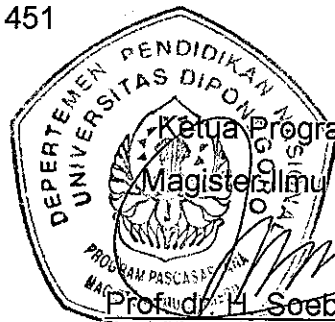
Menyetujui,  
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama

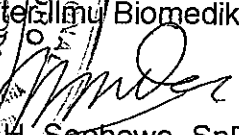
  
dr. Edi Dharmana, MSc, PhD  
NIP. 130 529 451

Pembimbing kedua

  
dr. Andrew Johan, Msi  
NIP. 131 673 437



Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Biomedik

  
Prof. dr. H. Soebowo, SpPA  
NIP. 130 352 549

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

UPT-PUSTAK-UN3IP	
No. Daft:	2152/T/mb/4
Tgl.	3 Feb 104

Semarang, 25 Juni 2003

Diana Nurhayati

## RIWAYAT HIDUP

Nama : Diana Nurhayati  
NIM : G4A0 00 004  
Tempat/tgl Lahir : Semarang, 20 Oktober 1974  
Alamat : JL. Wilis 18 A Semarang

### Riwayat Pendidikan :

- SD Kristen Gergaji Semarang, Lulus tahun 1986
- SMPN III Semarang, Lulus tahun 1989
- SMAN III Semarang, Lulus tahun 1992
- Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang, Lulus tahun 1996
- Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang, Lulus tahun 1998
- Magister Manajemen Universitas Diponegoro Semarang, Lulus tahun 2002

### Riwayat Pekerjaan :

- Staff pengajar Biokimia Fakultas Kedokteran UNDIP 1999 – sekarang

## KATA PENGANTAR

Pujian syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah swt atas karunia, berkat dan penyertaan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya akhir (tesis) ini.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang tidak terhingga kepada yang terhormat:

1. dr. Edi Dharmana, MSc, PhD, selaku pembimbing I yang atas kemurahan hati dan kesabarannya sebagai pembimbing dalam mengarahkan dan memberikan sumbangan pemikiran serta jalan keluar kepada saya, sejak dilontarkannya ide topik penelitian ini sampai disetujuinya karya akhir ini
2. dr. Andrew Johan, Msi, selaku pembimbing II yang dengan sabar berkenan meluangkan waktu serta perhatiannya dalam membimbing dan memberikan sumbangan pemikiran kepada saya, sejak dilontarkannya ide topik penelitian ini sampai disetujuinya karya akhir ini
3. Prof. dr. Kabulrachman, SpKK(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang telah memberikan kesempatan kepada staffnya untuk melanjutkan studi di Magister Ilmu Biomedik UNDIP.
4. dr. Pudjadi, SU, selaku Kepala Bagian Biokimia FK. UNDIP yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan studi di Magister Ilmu Biomedik UNDIP.
5. Prof. Dr. Soebowo, SpPA, selaku Direktur Program Pasca sarjana Universitas Diponegoro yang membuka peluang kepada siapa saja yang memenuhi

persyaratan untuk meningkatkan ilmu pengetahuan dan darma baktinya bagi bangsa dan negara.

6. Kepala Laboratorium Bioteknologi Universitas Diponegoro yang telah memberikan tempat, fasilitas dan tenaga yang sangat membantu penelitian ini.
7. dr. Setia Rahardja, dr Kusmiyati DK, M.Kes, dr. Innawati Jusuf, M.Kes dan dr. Dwi Ngestiningsih M.Kes, atas semua dukungannya kepada saya untuk dapat menyelesaikan tesis ini.
8. Bapak Dukut dan bapak Ngatimin yang sangat membantu dalam proses pelaksanaan penelitian.
9. Mbak Noor, yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan tugas-tugas saya di Bagian Biokimia FK.UNDIP selama menempuh pendidikan S2 Biomedik.
10. Mas Dul dan Mbak Nata yang banyak membantu dan penuh suka cita menjalankan tugasnya memperlancar segala proses administrasi pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik UNDIP ini.
11. Papi dan mami, terima kasih atas doa dan dukungannya
12. Saudara-saudaraku, Mas Rudi, Yetti, Yan, Yova, Hengki, Mbak Yanti, Anna yang telah banyak membantu dan memberikan dukungan kepada penulis
13. Rekan-rekan senasib seperjuangan angkatan tahun 2000 Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro.
14. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebut satu persatu, namun telah memberikan bantuan kepada penulis sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Akhirnya penulis berharap semoga Allah SWT melimpahkan berkat dan rahmatNya kepada semua pihak yang telah banyak membantu. Semoga karya akhir ini dapat bermanfaat bagi dunia pendidikan dan masyarakat luas serta dapat menambah pengetahuan bagi yang membutuhkannya.

Semarang, Juni 2003

Diana Nurhayati

## DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul .....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Daftar Pernyataan .....	iii
Riwayat Hidup .....	iv
Kata Pengantar .....	v
Daftar Isi .....	viii
Daftar Tabel .....	xi
Daftar Gambar .....	xii
Daftar Lampiran .....	xiii
Abstrak .....	xiv
Abstract .....	xv
 <b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	4
1.3. Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1. Tujuan Umum .....	4
1.3.2. Tujuan Khusus .....	5
1.4. Manfaat Penelitian .....	5
1.5. Originalitas .....	6
 <b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Epigallocatechin gallate (EGCg) Teh Hijau .....	7
2.2. Efek EGCg Teh Hijau Terhadap Sistem Imun .....	9
2.3. Alergi dan Hipersensitivitas .....	12
2.4. Keseimbangan $T_H1$ dan $T_H2$ Pada Reaksi Alergi .....	16
2.5. Mekanisme Efektor Pada Reaksi Alergi .....	19
2.5.1. Sel Mast Pada Reaksi Alergi .....	19



2.5.2. Basofil Pada Reaksi Alergi .....	20
2.5.3. Eosinofil Pada Reaksi Alergi .....	21
2.6. Pemeriksaan Eosinofil .....	23
2.7. Ovalbumin Sebagai Allergen .....	23

### **BAB III. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1. Kerangka Teori .....	26
3.2. Kerangka Konsep .....	27
3.3. Keterbatasan Penelitian .....	27
3.4. Hipotesis Penelitian .....	28

### **BAB IV. METODE PENELITIAN**

4.1. Rancangan penelitian .....	29
4.2. Populasi dan Sampel .....	31
4.2.1. Populasi .....	31
4.2.2. Sampel .....	31
4.2.2.1. Besar Sampel .....	31
4.2.2.2. Cara Pengambilan Sampel .....	32
4.3. Variabel Dan Definisi Operasional Variabel Penelitian .....	32
4.3.1. Variabel Bebas .....	32
4.3.2. Variabel Tergantung .....	33
4.3.2. Definisi Operasional .....	33
4.4. Tempat Dan Waktu Penelitian .....	35
4.5. Bahan Dan Materi Penelitian .....	35
4.6. Alat / Instrumen Penelitian .....	36
4.7. Prosedur Pengumpulan Data .....	36
4.8. Penentuan Dosis EGCg .....	37
4.9. Alur Kerja .....	38
4.11. Pemeriksaan .....	39
4.10.1. Pemeriksaan Kadar Interferon gamma .....	39
4.10.1.1. Prosedur Kultur Splenosit .....	39

4.10.1.2. Prosedur Pemeriksaan Interferon gamma .....	41
4.10.2. Pemeriksaan Hitung Jenis Eosinofil Darah Perifer .....	43
4.11. Analisis Data .....	46
<b>BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
5.1. Hasil Pengumpulan Data .....	47
5.2. Karakteristik Sampel .....	47
5.3. Kadar Interferon gamma .....	48
5.3.1. Analisis Data Kadar Interferon gamma .....	48
5.3.2. Pembahasan Kadar Interferon gamma .....	50
5.4. Eosinofil .....	54
5.4.1. Analisis Data Jumlah Eosinofil .....	54
5.4.2. Pembahasan Eosinofil .....	57
<b>BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN</b>	
6.1. Simpulan .....	60
6.2. Saran .....	60
<b>BAB VII. RINGKASAN</b> .....	62
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	65

## DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Definisi operasional	34
2	Rerata Kadar Interferon Gamma	48
3	Hasil Tes LSD Kadar Interferon Gamma	50
4	Rerata Jumlah Eosinofil Per 100 Leukosit	54
5.	Hasil Tes LSD Rerata Jumlah Eosinofil Per 100 / Leukosit	56

## DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Sediaan darah hapus dan tempat penghitungan hitung jenis Leukosit	45
2	Grafik Boxplot kadar Interferon Gamma pada tiap kelompok perlakuan	49
3	Grafik Boxplot jumlah eosinofil per 100 leukosit pada tiap kelompok perlakuan	55

## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Hasil Pemeriksaan ELISA Kadar Interferon Gamma	71
2	Data Interferon Gamma dan Hitung Jenis Leukosit	72
3	Standar Interferon Gamma	74
4	Hasil Analisis Statistik Interferon Gamma	75
5	Hasil Analisis Statistik Hitung Jenis Eosinofil	77
7	Jadwal Penelitian	79

## ABSTRAK

*Epigallocatechin gallate* (EGCg) merupakan jenis catechin yang paling besar jumlahnya di dalam daun teh hijau yang memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan sebagai anti tumor, anti mikroba dan anti alergi.

Atopi merupakan respon tubuh terhadap paparan antigen dari lingkungan yang ditandai oleh produksi IgE spesifik. Keadaan atopi biasanya dihubungkan dengan penyakit alergi seperti asma, *hay fever* dan eksema. Sel T limposit diduga terkait dengan patogenesis terjadinya alergi. Sel T helper dapat dibagi menjadi dua subset,  $T_H1$  dan  $T_H2$ , berdasarkan sitokin yang diproduksi.  $T_H1$  dapat melepaskan  $IFN-\gamma$  dan IL-2, sementara itu  $T_H2$  dapat mensekresi IL-4, IL-5 dan IL-13 yang akan mempengaruhi sel B untuk menghasilkan IgE dan bertanggung jawab terhadap mobilisasi dan aktivasi eosinofil dan sel mast yang biasanya dihubungkan dengan alergi. Subset sel T  $CD4^+$  ini dapat saling mempengaruhi, sekali salah satu subset menjadi dominan, maka sangat sulit bagi subset yang lain untuk jadi dominan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh *Epigallocatechin gallate* teh hijau terhadap respon alergi mencit BALB/c yang disensitisasi dengan ovalbumin.

Subyek penelitian adalah mencit galur BALB/c, umur 6 minggu sebanyak 24 ekor. Untuk menginduksi reaksi alergi mencit disensitisasi 100 ug OVA dalam 0,1 ml alum adjuvant i.p pada hari 1 dan 14, dan diberi suplementasi EGCg selama 28 hari sebagai imunomodulator. Pada hari ke 29 diambil sampel dari darah tepi dan limpa untuk dilakukan pemeriksaan. Eosinofil / 100 leukosit diperiksa dengan cara melakukan hitung jenis leukosit dari preparat hapus darah tepi dan konsentrasi  $IFN-\gamma$  diukur dengan metode ELISA dari kultur splenosit.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian EGCg meningkatkan kadar  $IFN-\gamma$  pada BALB/c yang disensitisasi OVA meskipun tidak bermakna ( $p > 0,05$ ) dan EGCg mampu menurunkan jumlah eosinofil /100 leukosit darah tepi BALB/c yang disensitisasi OVA menurun bermakna ( $p < 0,05$ ).

Kata kunci : : *Epigallocatechin gallate*, respon alergi, Interferon gamma, eosinofil.

## ABSTRACT

Epigallocatechin gallate (EGCg) is a major form of tea catechin and has a variety of biological activities, including anti tumor, anti microba and anti allergy.

Atopy is defined as the production of specific IgE in response to exposure to common environmental allergens. Being atopy is strongly associated with allergic disease such as asthma, hay fever, and eczema. T lymphocyte have been implicated in the pathogenesis of allergic disease. T helper lymphocytes can be broadly divided into two subsets  $T_H1$  and  $T_H2$  based on their cytokine secretion patterns.  $T_H1$  cells released IFN  $\gamma$  and IL-2 whereas  $T_H2$  cells release IL-4, IL-5 and IL-13 cytokines which act on B cells to result in switch to IgE and also are involved in mobilization and activation of cells such as eosinophils and mastcells which is often associated with allergic. It is also clear that the two  $CD^+4$  T cells subset can regulate each other; once one subset become dominant, it is often hard to shift the response to the other subset.

The objective of this study was to investigate the effect of Epigallocatechin gallate from green tea on reduce allergy response in BALB/c mice sensitized with ovalbumin.

Subject included 24 BALB/c mice 6 wk of age, divided into 4 groups. For the induction of allergic reaction, BALB/c mice were immunized intraperitoneally with 100  $\mu$ g OVA in 0,1 ml alum on day 1 and day 14. BALB/c mice were given EGCg supplementation for 28 days as immunomodulator. Peripheral blood sample and spleenocyte were taken on day 29. Eosinofil / 100 leukocyte was counted by differential counting of Leukocyte from peripheral blood smear staining with Giemsa. Concentrations of IFN- $\gamma$  in the spleenocyte culture were calculated with ELISA kits from murine.

The result of this study show that EGCg could increase the secretion of IFN- $\gamma$  even not significant ( $p>0,05$ ) and EGCg could decrease eosinofil/100 leukosit in peripheral blood significantly ( $p<0,05$ ).

Key words : Epigallocatechin gallate, allergy response, Interferon gamma, eosinofil.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Teh (*Camellia sinensis*) telah dipakai sebagai minuman sehari – hari sejak ribuan tahun yang lalu di Cina, dan sekarang teh merupakan minuman kedua yang paling banyak dikonsumsi manusia setelah air.<sup>1</sup> Secara tradisional teh banyak diketahui memiliki efek biologi yang menguntungkan bagi kesehatan, meskipun efek tersebut belum banyak dibuktikan di laboratorium sebelum tahun 1970-an.<sup>1</sup>

Komponen aktif teh yang bertanggung jawab terhadap efek biologi tersebut dikenal sebagai *catechin* (juga dikenal sebagai polifenol). Senyawa polifenol tersebut merupakan kandungan aktif teh hijau yang memiliki efek terhadap sistem imun.<sup>2,3</sup> Daun teh hijau kering memiliki kandungan 15 – 30% senyawa polifenol yang terdiri dari *Epigallocatechin gallate* (EGCg) (59,04%), *Epigallocatechin* (EGC) (19,28%), *Epicatechingallate* (ECG) (13,69%), *Epicatechin* (EC) (6,39%) dan *Gallocatechin* (GC) (1,60%).<sup>2,3</sup>

EGCg merupakan *catechin* utama yang terdapat di ekstrak teh dan merupakan bentuk yang paling aktif diantara semua jenis *catechin* serta memiliki efek biologi yang paling besar dibanding *catechin* yang lain. EGCg memiliki efek antikanker<sup>4</sup>, antimikroba<sup>5,6,7</sup>, antioksidan<sup>4,7,8</sup> dan anti alergi<sup>1,9</sup>.

EGCg dikenal memiliki efek imunomodulator setelah diketahui bioavailibilitasnya di plasma sangat tinggi setelah seseorang minum teh.<sup>10</sup> Pemberian



EGCg in vitro diketahui dapat meningkatkan produksi interleukin-12 dan interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) serta menurunkan produksi interleukin-10 pada kultur makrofag.<sup>11</sup> EGCg juga dapat menghambat pelepasan histamin dari sel mast pada tikus yang disensitisasi albumin.<sup>12</sup> Efek imunomodulator EGCg terhadap sel imun terutama sel T<sub>H2</sub> belum diteliti secara rinci, meskipun EGCg dikenal sebagai anti alergi.

Saat ini prevalensi terjadinya atopi yang merupakan predisposisi terjadinya penyakit alergi meningkat di seluruh dunia dibandingkan 20 tahun yang lalu. Angka kejadian asma meningkat rata-rata 5 % tiap tahunnya di Inggris. Hal yang sama juga terjadi di Swedia, Switzerland, Amerika Serikat, Australia dan negara-negara Asia seperti Taipei, dan Jepang. Pada negara berkembang hampir 30 – 40 % penduduknya memiliki atopi yang manifestasinya berupa asma (5 – 10%), rhinitis (10 – 20%) dan alergi makanan (10 – 20 %), dermatitis atopik (10%).<sup>14</sup> Kondisi tersebut terjadi tampaknya disebabkan adanya pemikiran mengenai “hipotesis higiene” dimana angka kejadian infeksi pada masa balita berkurang oleh karena meningkatnya taraf kehidupan sehingga angka kejadian alergi malah meningkat. Hal tersebut didukung oleh adanya paradigma keseimbangan T<sub>H1</sub>-T<sub>H2</sub> yang merupakan fokus penting dalam mempelajari imunologi terutama mengenai terjadinya alergi.<sup>13</sup>

Studi mengenai keseimbangan T<sub>H1</sub>-T<sub>H2</sub> tersebut mempelajari peranan limfosit T beserta subsetnya pada respon imun seluler. Studi tersebut mengemukakan bahwa pada *clone* sel T mencit dapat dibagi menjadi dua subset berdasarkan perbedaan produksi sitokin dan limfokinnya. Subset tersebut disebut T<sub>H1</sub> dan T<sub>H2</sub>. T<sub>H1</sub> yang teraktivasi akan memproduksi IL-2, IFN- $\gamma$  dan limfotoksin akan tetapi tidak memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-10. Kebalikannya T<sub>H2</sub> yang teraktivasi akan memproduksi IL-4, IL-5 dan

IL-10 dan tidak memproduksi IFN $\gamma$  dan IL-2 maupun limfotoksin.<sup>13</sup> Dilihat dari produksi sitokin tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa T<sub>H</sub>1 berperan pada imunitas seluler dan sel T<sub>H</sub>2 berperan menstimulasi sel limfosit B untuk memproduksi IgE dan berperan terhadap terjadinya alergi.<sup>14,15</sup>

Penderita alergi biasanya subset sel T-nya akan berkembang ke arah T<sub>H</sub>2 dominan.<sup>14</sup> Perkembangan sel T ke arah T<sub>H</sub>2 dominan tersebut ditandai dari meningkatnya IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13.<sup>14,15, 16, 17</sup> IL-4 yang diproduksi T<sub>H</sub>2 akan bertindak sebagai sitokin yang menginduksi aktivasi dan diferensiasi sel B dan mampu menginduksi MHC II dan Fc $\epsilon$ RII yang diekspresikan sel B sehingga memacu produksi IgE yang banyak terjadi pada penderita alergi.<sup>16</sup> IL-5 yang diproduksi T<sub>H</sub>2 akan merangsang pertumbuhan dan aktivasi faktor eosinofil yang bertanggung jawab terhadap terjadinya eosinofilia.<sup>16,17</sup> IL-5 juga dapat meningkatkan kemampuan eosinofil untuk bermigrasi ke jaringan. Jumlah eosinofil manusia yang sehat berkisar antara 2 – 4 % dari seluruh leukosit darah perifer, sedangkan pada penderita alergi, eosinofil akan terakumulasi pada jaringan tertentu diikuti dengan peningkatan eosinofil darah perifer.<sup>18</sup> Eosinofil dan sel T<sub>H</sub>2 merupakan sel inflamatori yang bertanggung jawab terhadap patogenesis terjadinya alergi pada penyakit asma, rinitis alergi, dan dermatitis atopi.<sup>17,18</sup>

Ovalbumin sebagai bahan yang dapat merangsang pembentukan respon imun ke arah T<sub>H</sub>2 dominan merupakan protein utama yang berasal dari putih telur ayam berupa glikoprotein dengan berat molekul 45.000 dalton. Ovalbumin merupakan alergen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya reaksi alergi tipe I pada manusia.<sup>19</sup> Ovalbumin sebagai bahan yang sering dipakai pada banyak penelitian untuk mengarahkan respon imun seluler ke arah T<sub>H</sub>2 dominan dapat diberikan secara inhalasi, oral maupun intra

peritoneal. Sensitisasi dengan ovalbumin baik secara inhalasi, oral maupun intraperitoneal terbukti dapat merubah kecenderungan respon imun mencit ke arah  $T_H2$ . Hal tersebut dibuktikan pada banyak penelitian<sup>20,21,22</sup>

Penelitian ini dilakukan oleh peneliti untuk mengetahui pengaruh pemberian *Epigallocatechin gallate* (EGCg) teh hijau terhadap respon alergi ( $T_H2$  dominan) mencit BALB/c yang disensitisasi dengan ovalbumin secara intraperitoneal dilihat dari produksi interferon gamma dan jumlah eosinofil darah perifer.

## 1.2. Perumusan Masalah

- Apakah *Epigallocatechin gallate* (EGCg) teh hijau berpengaruh terhadap penurunan respon alergi ( $T_H2$  dominan) mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin dilihat dari produksi interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) dan hitung jenis eosinofil darah perifer.

## 1.3. Tujuan Penelitian

### 1.3.1. Tujuan Umum :

- Membuktikan bahwa *Epigallocatechin gallate* (EGCg) teh hijau dapat menurunkan respon alergi ( $T_H2$  dominan) mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin dilihat dari produksi interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) dan hitung jenis eosinofil darah perifer.

### 1.3.2. Tujuan khusus

1. Membuktikan adanya pengaruh *Epigallocatechin gallate* teh hijau terhadap peningkatan produksi interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) oleh limfosit mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin dan diberi *Epigallocatechin gallate* teh hijau dengan mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin dan tidak diberi *Epigallocatechin gallate* teh hijau.
2. Membuktikan adanya pengaruh *Epigallocatechin gallate* teh hijau terhadap penurunan hitung jenis jumlah eosinofil darah perifer pada mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin dan diberi *Epigallocatechin gallate* teh hijau dengan mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin dan tidak diberi *Epigallocatechin gallate* teh hijau.

### 1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai penggunaan *Epigallocatechin gallate* (EGCg) yang merupakan komponen paling aktif teh hijau apakah dapat berperan sebagai imunomodulator untuk alergi sehingga dapat dipakai sebagai suplemen alternatif.

Hasil penelitian pada hewan coba ini diharapkan juga dapat dijadikan landasan untuk penelitian lebih lanjut mengenai efek EGCg teh hijau terhadap respon imun alergi pada manusia.

### 1.5. Originalitas

Penelitian mengenai pengaruh pemberian *Epigallocatechin gallate* (EGCg) teh hijau terhadap respon alergi mencit yang disensitisasi ovalbumin dilihat dari kadar interferon gamma dan jumlah eosinofil ini baru pertama kali dilakukan.

Selama ini penelitian EGCg lebih banyak difokuskan untuk pengobatan infeksi bakteri karena diduga memiliki efek antimikroba seperti yang dilakukan oleh Sakagami HM. (1995), Yam TS. (1997), dan Matsunaga (2001).<sup>7,11,23</sup>

Sedangkan penelitian mengenai efek EGCg sebagai komponen terbesar dari teh hijau sebagai anti alergi ditinjau dari pergeseran dominansi  $T_H2$  (dilihat kadar eosinofil) ke  $T_H1$  (dilihat kadar IFN- $\gamma$ ) belum ada. Yang sudah ada adalah efek EGCg terhadap reaksi alergi tipe 1 dilihat dari pengaruhnya terhadap penghambatan reaksi *Passive Cutaneous Anaphylaxis* (PCA) yang dilakukan oleh Shiozaki (1997), dan efek EGCg terhadap alergi ditinjau dari penghambatan produksi histamin oleh Tachibana H (2000).<sup>9,24</sup>

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. *Epigallocatechin gallate* (EGCg) Teh Hijau

Teh (*Camellia sinensis*) telah dipakai sebagai minuman sehari – hari sejak ribuan tahun yang lalu di Cina, dan sekarang teh merupakan minuman kedua yang paling banyak dikonsumsi manusia setelah air.<sup>1</sup> Secara tradisional teh banyak diketahui memiliki efek yang menguntungkan bagi kesehatan, meskipun efek tersebut belum banyak dibuktikan di laboratorium sebelum tahun 1970-an.<sup>1</sup> Efek yang menguntungkan tersebut antara lain teh merupakan antioksidan kuat, teh dapat membantu mempertahankan kolesterol plasma pada level yang menyehatkan sehingga dapat menurunkan resiko terjadinya penyakit kardiovaskuler dan menurunkan hipertensi, teh dapat mencegah dan menurunkan infeksi, dan dapat dipakai sebagai antitumor.<sup>1</sup>

Komponen aktif teh yang bertanggung jawab terhadap efek biologi dikenal sebagai catechin (juga dikenal sebagai polifenol). Senyawa polifenol tersebut merupakan kandungan aktif teh hijau yang memiliki efek terhadap sistem imun.<sup>2,3</sup> Daun teh hijau kering memiliki kandungan 15 – 30% senyawa polifenol yang terdiri dari *Epigallocatechin gallate* (EGCg) (59,04%), *Epigallocatechin* (EGC) (19,28%), *Epicatechingallate* (ECG) (13,69%), *Epicatechin* (EC) (6,39%) dan *Gallocatechin* (GC) (1,60%).<sup>2,3</sup> Kelima jenis catechin tersebut memiliki kemampuan yang berbeda apabila ditinjau dari efek biologinya sebagai antimikroba dan antikanker.<sup>2,3</sup>

*Epigallocatechin gallate* (EGCg) merupakan *catechin* utama yang terdapat di ekstrak teh dan merupakan bentuk yang paling aktif diantara semua jenis catechin serta memiliki efek biologi yang paling besar dibanding *catechin* yang lain. EGCg memiliki efek antikanker <sup>4</sup>, antimikroba <sup>5,6,7</sup>, antioksidan <sup>4,8</sup> dan anti alergi <sup>1,9</sup>. EGCg dikenal memiliki efek imunomodulator setelah diketahui bioavailibilitasnya di plasma sangat tinggi setelah seseorang minum teh <sup>10</sup>.

Nakagawa K. dkk (1997) melaporkan tentang orang sehat dengan kadar EGCg dan EGC dalam plasma sebelum perlakuan dibawah kadar yang terdeteksi (< 2 pmol/ml), kemudian diberikan kapsul ekstrak teh hijau yang memiliki kandungan 225, 375, 525 mg EGCg dan 7.5, 12.5, 17.5 mg EGC. 90 menit sesudah perlakuan tersebut, kadar EGCg dan EGC dalam plasma mencapai 657, 4300, 4410 pmol EGCg/ml, dan 35, 144, 255 pmol EGC/ml (0,2 – 2,0% dari dosis yang diberikan). <sup>10</sup>

Molekul polifenol yang diberikan pada dosis tinggi (2 g peroral) mengakibatkan ditemukannya *catechin* bebas dalam plasma setelah 30 menit pemberian. *Catechin* yang terkonjugasi (*methyl-catechin*) mulai ditemukan setelah 2 jam pemberian, dan setelah 8 jam maka 40% dari catechin sudah berikatan dengan gugus *methyl*, sulfat atau glucuronida. Tetapi hanya catechin yang terkonjugasi ditemukan dalam plasma apabila polifenol diberikan pada dosis kecil (beberapa milligram per oral). <sup>10</sup>

Chow HH. dkk (2001) melaporkan tentang kadar rata-rata EGCg bebas dalam plasma setelah pemberian EGCg dan *polyphenon E* (*decaffeinated green tea*) per oral secara acak pada 20 orang sehat (setiap 5 orang dengan dosis yang sama). Masing-masing peserta meminum satu dari dosis tunggal (200, 400, 600 dan 800 mg berdasarkan kandungan EGCg). Kadar EGCg bebas dalam plasma setelah 24 jam

perlakuan tersebut diperoleh: 22.5 versus 21.9, 35.4 versus 52.2, 101.9 versus 79.7, 167.1 versus 161.4 x microg EGCG/ml plasma. EGC dan EC dalam plasma berada dalam bentuk yang terkonjugasi dengan glukoronida atau sulfat. Tidak ditemukan perbedaan yang bermakna terhadap karakteristik farmakokinetik dari EGCg pada ke dua cara pemberian tersebut. Pemberian EGCg dosis tinggi (800 mg) secara signifikan meningkatkan kadar EGCg dalam plasma jika dibandingkan dengan dosis yang lebih rendah (200 mg dan 400 mg).<sup>25</sup>

## 2.2. Efek EGCg Teh Hijau Terhadap Sistem Imun

*Epigallocatechin gallate* (EGCg) adalah jenis *catechin* yang paling banyak dan paling aktif yang ditemukan pada teh hijau. Daun teh hijau kering memiliki kandungan *Epigallocatechin gallate* sebanyak 59,04 %.<sup>2,3</sup> *Catechin* tersebut diketahui memiliki efek terhadap sistem imun.<sup>2,3</sup>

*Catechin* teh hijau dapat meningkatkan ketahanan limfosit dari penderita diabetes terhadap kerusakan DNA akibat *standard oxidative challenge* dengan hidrogen peroksida apabila penderita tersebut telah meminum teh hijau selama 2 minggu. Efek tersebut dibutuhkan sistem imun sebab pada penderita yang terinfeksi bakteri terjadi peningkatan produksi senyawa oksigen reaktif.<sup>3</sup> Kadar *catechin* dalam plasma dari penderita tersebut meningkat dari 5,6 ng/ml menjadi 72,1 ng/ml. Berkurangnya kerusakan DNA limfosit tersebut tidak berhubungan dengan kadar vitamin C, karoten dan vitamin E dalam plasma. Sehingga dapat disimpulkan bahwa efek biologik tersebut berhubungan dengan kadar *catechin* teh hijau dalam plasma.<sup>26</sup>



Penelitian Johan A. dkk, dimana mencit diberikan minuman tambahan 70 mg teh hijau setiap hari selama 4 minggu kemudian diinokulasi dengan *Listeria monocytogenes* intra peritoneal didapatkan peningkatan kemampuan fagositosis makrofag dan peningkatan respons proliferasi limfosit<sup>27</sup>.

Peranan *catechin* terhadap produksi sitokin sel T<sub>H</sub>1 dan T<sub>H</sub>2 yang dihubungkan dengan kemampuannya menghambat aktivasi *nuclear factor-κB* (NF- κB) juga telah diteliti oleh Tomita M. dkk (2000), dimana pada penelitiannya dikemukakan *catechin* dan pigmen teh dapat menghambat aktivasi NF- κB, yaitu faktor transkripsi yang terlibat dalam regulasi molekuler sejumlah inflamatori sitokin. Sitokin yang diproduksi sel T<sub>H</sub>1 sel CD4<sup>+</sup>, yaitu IL-2 dan IFN-γ, yang membutuhkan NF- κB untuk ekspresi gennya secara selektif akan dihambat oleh *catechin*. *Catechin* tersebut akan menekan sekresi IL-2, ekspresi gen IL-2 dan aktivasi NF- κB di limpa mencit yang kaya akan sel T CD4<sup>+</sup>. *Catechin* juga dapat menghambat produksi IFN-γ-mRNA. Selain berpengaruh terhadap sel T<sub>H</sub>1, *catechin* secara tidak diduga juga menghambat ekspresi sitokin sel T<sub>H</sub>2, IL-4 dan IL-5, yang hanya sedikit memiliki NF- κB di promoternya. Dari penelitiannya tersebut Tomita dkk (2002) menyimpulkan NF- κB mungkin merupakan salah satu dari banyak faktor transkripsi yang dihambat oleh *catechin*.<sup>28</sup>

EGCg terbukti juga dapat menstimulasi produksi *interleukin-1 alpha* (IL-1α), *interleukin-1 betha* (IL-1β), dan *tumour necrosis factor alpha* (TNFα) oleh kultur sel mononuklear perifer.<sup>11</sup> Pemberian *Epigallocatechin gallate* in vitro dapat meningkatkan produksi *interleukin-12* dan *interferon-gamma* (IFN-γ) serta menurunkan produksi interleukin-10 pada kultur makrofag.<sup>12</sup> Pemberian EGCg 0,5 ug/ml dapat menghambat pertumbuhan *Legionella pneumophila* dalam kultur makrofag. Efek tersebut hilang

apabila dilakukan penambahan antibodi anti-IFN-gamma dan anti-TNF-alpha.<sup>12</sup> EGCg juga memiliki efek proteksi terhadap radiasi ultraviolet yang menyebabkan immunosupresi dan immunotoleransi, dimana EGCg akan menyebabkan berkurangnya produksi IL-10 dan meningkatnya produksi IL-12 di sel epidermal dan dermal.<sup>4,12</sup>

EGCg teh hijau sebagai anti alergi juga sudah mulai banyak dibuktikan meskipun belum dilihat dari polarisasi  $T_H1$  dan  $T_H2$ . Pada penelitian Shiozaki dkk (1997), dibuktikan bahwa polifenol dari ekstrak teh hijau, teh hitam dan teh oolong dapat menghambat reaksi *passive cutaneous anaphylaxis* (PCA) pada mencit. Menurut penelitian tersebut terbukti dari semua komponen polifenol yang dicobakan antara lain *Epigallocatechin gallate* (EGCg), *Epicatechin gallate* (ECg) dan *Epigallocatechin* (EGC), EGCg memiliki efek penghambat paling besar dibanding ECg dan EGC. Penelitian Shiozaki tersebut membuktikan bahwa EGCg secara signifikan dapat mencegah terjadinya reaksi alergi tipe I.<sup>9</sup> EGCg sebagai anti alergi dibuktikan juga oleh Tachibana H. dkk (2000), dimana EGCg mampu menghambat produksi histamin dengan jalan menghambat kerja enzim *histidin decarboxylase* dan menghambat proses degranulasi basofil pada basofil manusia.<sup>24</sup> Penelitian lain yang dilakukan Sano M. dkk.(1999), juga membuktikan bahwa pemberian secara oral dua derivat *catechin* yaitu *Epigallocatechin 3-O-(3-O-methyl) gallate* dan *Epigallocatechin 3-O-(4-O-methyl) gallate* dari teh oolong secara signifikan dapat menghambat reaksi alergi tipe I pada mencit yang disensitisasi dengan ovalbumin dan *incomplet Freund's adjuvant*.<sup>29</sup>

### 2.3. Alergi Dan Hipersensitivitas

Definisi alergi yang pertama kali dikemukakan oleh von Pirquet adalah suatu istilah yang merujuk pada semua bentuk perubahan reaktifitas sistem imun yang disebabkan oleh stimulasi antigen yang selain menghasilkan respon melindungi tubuh *host* (imunitas) juga dapat menimbulkan respon yang merugikan bagi antigen (hipersensitivitas). Dahulu istilah alergi dipakai untuk menggambarkan semua manifestasi sistem imun baik yang menguntungkan maupun yang merugikan bagi tubuh, akan tetapi saat ini istilah yang dipakai untuk menggambarkan manifestasi sistem imun untuk melawan antigen asing maupun *self* antigen yang dapat bersifat menguntungkan maupun merugikan tubuh disebut respon imun. Sedangkan istilah alergi sendiri khusus dipakai untuk menggambarkan keadaan respon imun yang membahayakan bagi tubuh.<sup>17</sup>

Saat ini istilah alergi lebih dibatasi lagi menjadi reaksi alergi yaitu suatu keadaan yang menggambarkan respon imun terhadap antigen dari lingkungan atau biasa disebut alergen. Alergen tersebut dapat berupa makanan, obat-obatan, *pollen* dan lain-lain.<sup>16,17</sup>

Reaksi alergi ini merujuk pada respon imun didapat yang melibatkan antibodi spesifik (IgE) dan sel T dengan beberapa gejala klinik berupa mata berair, peningkatan sekresi hidung dan bersin pada *hay fever*, sesak dan batuk pada asma, kulit kemerahan dan gatal pada urtikaria. Sedangkan reaksi alergi yang menyebabkan kerusakan jaringan dan berbahaya bagi tubuh disebut reaksi hipersensitivitas.<sup>16,17</sup>

Reaksi hipersensitivitas oleh Gell and Coomb diklasifikasikan menjadi 4 tipe yaitu<sup>16</sup> :

1. Hipersensitivitas tipe I biasa disebut hipersensitivitas tipe cepat (*immediate hypersensitivity*) yaitu reaksi hipersensitivitas yang terjadi apabila alergen atau antigen bereaksi dengan IgE spesifik yang terikat pada bagian Fc sel mast atau sel-sel basofil yang beredar. Hal ini menyebabkan degranulasi sel mast dan keluarnya zat-zat mediator inflamasi.
2. Hipersensitivitas tipe II biasa disebut reaksi sitotoksik (*cytotoxic reaction*) yaitu reaksi hipersensitivitas yang terjadi apabila antibodi bereaksi antigen atau hapten di permukaan sel yang menyebabkan terjadinya fagositosis sel dengan cara opsonisasi. Proses sitotoksik diatas melibatkan komplemen yang biasanya menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan.
3. Hipersensitivitas tipe III atau reaksi kompleks imun (*immune-complex reaction*) yaitu hipersensitivitas yang terjadi akibat pembentukan kompleks-kompleks imun antara antigen dan antibodi humoral yang menyebabkan pengaktifan komplemen.
4. Hipersensitivitas tipe IV atau hipersensitivitas tipe lambat dengan perantara sel (*delayed hypersensitivity*) yaitu reaksi hipersensitivitas yang melibatkan limfosit T yang tersensitisasi oleh antigen akan mengeluarkan sitokin.

Meskipun Gell dan Comb telah mengklasifikasikan reaksi alergi dengan jelas, namun patogenesis terjadinya alergi ternyata lebih kompleks.<sup>17</sup> Dan ternyata mayoritas pasien penderita alergi yang datang ke klinik biasanya menderita alergi yang berhubungan dengan respon imun yang diperantarai IgE. IgE sendiri diketahui memiliki kontribusi yang besar pada patogenesis terjadinya penyakit-penyakit alergi.<sup>16</sup>

Alergi yang diperantarai oleh IgE sering dikenal sebagai hipersensitivitas tipe I. Reaksinya bisa mengenai kulit (urtikaria dan eksema), mata (conjungtivitis), nasofaring (rhinorrhea, rhinitis), saluran nafas (asma) dan saluran pencernaan (gastroenteritis). Keluhannya bisa hanya berupa rasa tidak nyaman namun bisa juga mengakibatkan kematian. Reaksi alergi ini biasanya membutuhkan waktu 15 – 30 menit setelah pemaparan antigen, namun bisa berlanjut sampai 10 atau 12 jam. Alergi ini diperantarai oleh IgE namun komponen selular yang terlibat adalah sel mast dan basofil yang dibantu oleh platelet, netrofil dan eosinofil. Pada biopsi jaringan biasanya yang nampak adalah sel mast dan eosinofil.<sup>30</sup>

Basofil dan sel mast mempunyai fungsi dan karakteristik yang sama, namun ada bukti yang menyatakan bahwa basofil dalam darah akan berkembang menjadi sel mast pada jaringan. Kedua tipe sel ini berikatan erat dengan reseptor untuk IgE yaitu (FcεR). Sel ini sangat penting pada penyakit alergi atopi seperti eksema, *hay fever* dan *asthma*.<sup>30</sup>

Selain itu mast sel dan basofil merupakan sel penting yang menghasilkan sitokin inflamatori setelah peristiwa inisiasi pengikatan alergen. Sintesa sitokin oleh mast sel dan basofil akan diproses melalui pengaturan *aktivasi Signal Transducer and Activators of transcription* (STAT) dan *Nuclear Factor – κB* (NF- κB).<sup>31</sup>

Penderita atopi di barat yang berjumlah hampir 40 % dari populasi menunjukkan peningkatan respon IgE terhadap berbagai macam alergen dari lingkungan pada saat mereka mengalami serangan alergi. Individu dengan atopi mempunyai total IgE dan eosinofil di sirkulasi lebih tinggi dibandingkan orang normal, oleh sebab itu penderita atopi lebih mudah terkena penyakit alergi seperti eksema, *hay fever* dan asma.<sup>30,31</sup>

Studi pada keluarga dengan atopi telah dapat mengidentifikasi adanya regio pada kromosom 11q dan 5q yang tampaknya penting untuk menentukan apakah seseorang atopi atau tidak. Gen pada kromosom 11 ini mengkode subunit  $\beta$  reseptor IgE yang memiliki afinitas tinggi. Sedangkan pada kromosom 5 terdapat sekelompok gen yang mengatur IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12, IL-13 dan *Granulocyte – macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF). Sitokin ini berperan penting dalam IgE *switching*, *survival* eosinofil dan proliferasi sel mast.<sup>31</sup>

Faktor genetik meskipun diketahui berperan dalam penyakit alergi yang diperantarai oleh IgE, ternyata faktor lingkungan lebih berperan pada proses terjadinya alergi. Hal tersebut dibuktikan melalui observasi pada wilayah-wilayah dengan keadaan ekonomi yang semakin meningkat, dimana pada wilayah-wilayah tersebut angka kejadian alergi meningkat pesat. Faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap terjadinya alergi tersebut adalah perubahan terhadap paparan penyakit infeksi pada masa kanak-kanak, polusi pada lingkungan, tingkat alergen dan perubahan pola makan.<sup>31</sup>

Perubahan terhadap paparan mikroba patogen merupakan penjelasan yang paling masuk akal terhadap peningkatan alergi atopi, dimana pada penderita atopi tidak ditemukan riwayat infeksi terhadap virus cacar ataupun hepatitis A, dan tes tuberkulin kulit menunjukkan hasil positif. Kebalikannya adalah pada anak-anak yang mengalami serangan bronchiolitis yang disebabkan *Respiratory syncytial virus* (RSV) dimana pada anak-anak tersebut didapatkan rasio jumlah IFN- $\gamma$  lebih tinggi daripada IL-4 (merupakan sitokin yang berperan pada respon  $T_H2$  dominan). Hal diatas menyimpulkan bahwa infeksi bakteri membangkitkan respon imun ke arah  $T_H1$  pada

masa kanak-kanak yang berakibat akan menurunkan respon imun ke arah  $T_H2$  pada kehidupan selanjutnya.<sup>31</sup>

Dari penjelasan diatas dapat diketahui selain IgE, yang memiliki peran penting pada penyakit-penyakit alergi adalah sitokin yang diproduksi oleh sel  $T_H2$  antara lain IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13.<sup>16,17,31</sup>

#### 2.4. Keseimbangan $T_H1$ dan $T_H2$ Pada Reaksi Aleri.

Respon imun yang meningkat akibat infeksi parasit atau paparan antigen lingkungan yang tidak berbahaya yang berhubungan dengan peningkatan produksi IgE diketahui dipicu oleh antigen yang spesifik terhadap sel  $T_H2$ . Sintesa IgE membutuhkan sitokin yang disekresi oleh sel  $T\ CD4^+$ . Sel ini dapat dibagi menjadi dua subset yaitu sel  $T_H1$  dan sel  $T_H2$  berdasar fungsi dan sitokin yang diproduksi. Sel  $T_H1$  terutama sekali menghasilkan sitokin IL-2, IFN- $\gamma$ , dan *Tumour Nekrosis Factor*- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) yang berfungsi pada perkembangan respon imun seluler. Sedangkan sel  $T_H2$  mensekresi sitokin IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan IL-13 yang penting perkembangan respon imun humoral termasuk didalamnya respon alergi yang berhubungan dengan IgE. Meskipun tidak semua penyakit imunologi dapat mudah diklasifikasikan berdasarkan dominan tidaknya sel  $T_H1$  dan  $T_H2$ , penyakit alergi diketahui disebabkan karena dominannya sel  $T_H2$ .<sup>32</sup>

Alergen yang mampu menginduksi diferensiasi sel *T helper naive* ( $T_H0$ ) menjadi sel  $T_H2$  dipengaruhi oleh banyak faktor. Dan tampaknya dibutuhkan adanya IL-4 pada awal terjadinya respon imun terutama pada respon imun yang berhubungan

dengan IgE. Sumber dari IL-4 ini adalah sel T CD4<sup>+</sup>, sel mast, basophil dan eosinofil.<sup>33</sup> Sel T<sub>H0</sub> yang teraktivasi akan memproduksi IL-4 melalui STAT6 yang akan mempengaruhi diferensiasi sel T<sub>H0</sub> ke arah sel T<sub>H2</sub>. Akan tetapi apabila ada pengaruh IL-12 yang berasal dari makrofag ataupun sel dendrit yang teraktivasi sel T<sub>H0</sub> akan berdiferensiasi ke arah sel T<sub>H1</sub> melalui aktivasi STAT4.<sup>31</sup>

Selain IL-4, sintesa IgE juga membutuhkan adanya ikatan antara alergen dan sel B melalui *membrane-bound immunoglobulin receptor*. Sel B kemudian memproses alergen dan mempresentasikan alergen yang telah diproses berupa fragmen peptida yang berasosiasi dengan molekul MHC-II ke sel T<sub>H2</sub>. Komplek peptida – MHC II ini akan dikenali oleh reseptor sel T (TCR) pada sel T<sub>H2</sub>. Sekali teraktivasi sel T akan memberikan sinyal kepada sel B untuk memproduksi IgE. Pertama T<sub>H2</sub> teraktivasi akan mensekresi sitokin yang berperan untuk IgE-*switching* yaitu IL-4 dan / atau IL-13. Kemudian dibutuhkan adanya kontak antara sel B dan sel T agar IgE dapat diproduksi. Kontak tersebut diperantarai oleh ligan CD40(CD40L) yang diekspresikan di permukaan sel T<sub>H2</sub> dan CD40 yang ada di permukaan sel B.<sup>33</sup>

Peranan utama IL-4 dalam menginduksi produksi IgE dibuktikan secara *in vivo* memakai mencit yang mengekspresikan IL-4 secara berlebihan. Pada mencit transgenik IL-4 menghasilkan IgE sangat tinggi dalam serumnya dan mengalami gangguan kulit seperti alergi. Sedangkan pada mencit transgenik IL-4 yang diterapi dengan anti IL-4 atau antibodi anti IL-4 reseptor tidak menunjukkan adanya produksi IgE.<sup>34</sup> Penelitian lain membuktikan mencit *knock-out* IL-4 tidak mampu mensintesa IgE pada saat diinfeksi dengan *Leishmania major*.<sup>33</sup>



Selain IL-4 yang mempengaruhi IgE - *switching* adalah IL-13. IL-4 dan IL-13 mempunyai sifat biologi yang saling *overlapping* dalam menginduksi aktivasi dan proliferasi sel B, serta *class switching* IgE pada manusia dan IgG4. Kedua sitokin tersebut diproduksi oleh sel T teraktivasi, sel mast, basophil.<sup>33</sup>

Berbagai macam sitokin juga dideteksi mampu memodulasi sintesa IgE. Sitokin yang diketahui mampu menghambat sintesa IgE adalah IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-8, dan IL-12. Sitokin tersebut bertindak baik secara langsung mempengaruhi proses *switching* IgE dan diferensiasi sel B maupun secara tidak langsung melalui efeknya terhadap sel T.<sup>17</sup>

Dilihat dari sitokin yang dihasilkan T<sub>H</sub>2 yang dapat merangsang pembentukan IgE maka saat ini banyak terapi yang targetnya menghambat produksi sitokin T<sub>H</sub>2. Produksi sitokin T<sub>H</sub>2 tersebut dapat dihambat oleh sitokin yang dihasilkan oleh sel T<sub>H</sub>1 dimana banyak penelitian *in vitro* yang membuktikan terjadinya penurunan produksi IL-4 yang dapat menstimulasi sintesa IgE setelah diberi IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-8, dan IL-12. IFN- $\gamma$  dan IFN- $\alpha$  terbukti juga mampu menurunkan sintesa IgE *in vivo*.<sup>32</sup>

IFN- $\gamma$  ini akan meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas II.<sup>31</sup> IFN- $\gamma$  dan IL-12 yang merupakan sitokin utama dalam proses diferensiasi T<sub>H</sub>0 ke arah sel T<sub>H</sub>1 akan mempunyai efek mencegah pembentukan sel T<sub>H</sub>2. IFN- $\gamma$  sangat kuat dapat berperan secara spesifik menghambat IL-4. Sedangkan IL-4 adalah sitokin yang diproduksi oleh limfosit dan sel mast, dimana mampu menginduksi diferensiasi dari sel limfot T<sub>H</sub>2 dan memicu sel B untuk memproduksi IgE dan IgG4.<sup>33</sup>

Penelitian sebelumnya pernah membuktikan bahwa IFN- $\gamma$  yang mendominasi respon imun, secara signifikan mampu menurunkan insiden asma. Penelitian lain

menyatakan bahwa pemberian IFN- $\gamma$  atau IL-12, yang menginduksi respon imun ke arah T<sub>H</sub>1 dilaporkan bisa menekan *eosinophilia* pada saluran nafas dan produksi IgE pada mencit.<sup>36</sup>

## **2.5. Mekanisme Efektor Pada Reaksi Alergi**

### **2.5.1. Sel Mast Pada Reaksi Alergi**

Reaksi alergi terpacu pada saat alergen berikatan dengan IgE yang terikat pada Fc $\epsilon$ RI di sel mast. Sel mast ini akan berada di permukaan tubuh dan berfungsi untuk memberikan tanda terhadap sistem imun adanya suatu infeksi lokal. Sekali teraktivasi, sel mast akan menginduksi reaksi inflamasi dengan cara mensekresi mediator kimia yang disimpan di dalam granulanya serta akan mensintesa leukotrien dan sitokin setelah terjadinya aktivasi.<sup>31</sup>

Pada alergi, sel mast ini akan membangkitkan reaksi yang sangat tidak menyenangkan terhadap antigen yang tidak berbahaya yang tidak berhubungan dengan patogen yang harus dieliminir. Konsekwensinya IgE yang dapat menyebabkan aktivasi sel mast, akan tergantung dari dosis antigen dan rute masuknya antigen. Gejalanya bisa ringan berupa iritasi akibat menghirup pollen sampai dengan yang berat yang dapat mengancam jiwa seperti syok anafilaktik.<sup>31</sup>

Reaksi alergi fase cepat yang disebabkan oleh degranulasi sel mast biasanya diikuti oleh inflamasi yang berlarut-larut atau biasa disebut respon fase lambat. Respon fase lambat ini akan melibatkan rekrutmen sel efektor yang lain, antara lain limfosit

$T_H2$ , eosinofil, dan basofil yang secara signifikan menyumbang terjadinya respon alergi.<sup>31</sup>

Saat teraktivasi sel mast akan mensintesa dan melepaskan kemokin, mediator lipid seperti leukotrien, *platelet activating factor* (PAF) dan sitokin yaitu IL-4 dan IL-13 yang akan mengekalkan respon  $T_H2$ . Mediator – mediator ini akan berperan pada respon inflamasi akut dan kronik mediator lipid umumnya menyebabkan kontraksi otot polos, peningkatan permeabilitas, sekresi mukus dan menginduksi aktivasi leukosit yang berperan pada respon fase lambat. Leukotrien berfungsi untuk mempertahankan respon inflamasi di jaringan.<sup>31</sup>

### 2.5.2. Basofil Pada Reaksi Alergi

Pada reaksi alergi, degranulasi sel mast dan aktivasi sel  $T_H2$  selain menyebabkan terakumulasinya eosinofil dalam jumlah besar pada tempat terjadinya alergi juga didapatkan basofil meski tidak sebanyak eosinofil.<sup>31</sup>

*Growth factor* untuk basofil ini sama dengan *growth factor* untuk eosinofil termasuk didalamnya IL-3, IL-5 dan GM-CSF. Seperti halnya eosinofil, basofil akan mengekspresikan FcεRI pada permukaan selnya dan akibat dari aktivasi sitokin ataupun antigen, basofil akan melepaskan histamin dan IL-4 dari granula basofiliknya.<sup>31</sup>

Sel mast, basofil dan eosinofil dapat berinteraksi satu sama lain. Dimana degranulasi eosinofil dengan dilepaskannya *major basic protein*, dapat mengakibatkan degranulasi sel mast dan basofil. Efek ini diperbesar oleh sitokin yang mempengaruhi

pertumbuhan, diferensiasi dan aktivasi basofil dan eosinofil seperti IL-3, IL-5 dan GM-CSF.<sup>31</sup>

### 2.5.3. Eosinofil Pada Reaksi Alergi.

Eosinofil merupakan leukosit bergranula yang berasal dari sumsum tulang. Dinamakan eosinofil oleh karena granulanya mengandung arginin yang kaya akan protein yang akan berwarna merah apabila diberi pewarnaan *acidic eosin*. Normalnya eosinofil ini hanya ada sedikit di sirkulasi, dan kebanyakan ditemukan di jaringan terutama di jaringan ikat seperti saluran nafas, usus, epitel urogenital.<sup>31</sup>

Eosinofil ini mempunyai 2 fungsi efektor. Pertama, pada saat teraktivasi ia akan melepaskan granula protein beracun dan radikal bebas, yang selain dapat membunuh mikroorganisme dan parasit juga dapat menyebabkan kerusakan jaringan akibat reaksi alergi. Kedua, aktivasi eosinofil akan menginduksi disintesisnya mediator kimia seperti prostaglandin, leukotrien dan sitokin yang dapat memperbesar respon inflamasi dengan cara mengaktifkan sel epitel, merekrut dan mengaktifkan lebih banyak sel-sel eosinofil dan leukosit.<sup>31</sup>

Degranulasi sel mast dan aktivasi  $T_H2$  menyebabkan eosinofil terakumulasi dalam jumlah besar dan siap untuk diaktifkan, pada reaksi alergi lokal. Kehadiran eosinofil tersebut menandakan terjadinya inflamasi alergi kronik dan menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan.<sup>31,37</sup>

Eosinofil dan mast sel dapat berinteraksi satu sama lain, dimana degranulasi eosinofil akan melepaskan *major basic protein*, yang dapat menyebabkan terjadinya

granulasi sel mast. Efek ini akan diperbesar oleh sitokin yang mempengaruhi pertumbuhan, diferensiasi dan aktivasi eosinofil yaitu IL-3, IL-5 dan GM-CSF.<sup>17,31,35</sup>

Aktifasi dan degranulasi eosinofil harus diatur secara tepat, oleh karena aktivasi eosinofil yang tidak tepat dapat membahayakan *host*. Yang pertama kali mengontrol produksi eosinofil adalah sumsum tulang. Eosinofil hanya diproduksi sedikit apabila tidak ada infeksi. Akan tetapi apabila sel  $T_H2$  teraktivasi, sitokin seperti IL-5 akan dilepaskan dan hal tersebut dapat meningkatkan produksi eosinofil di sumsum tulang dan akan melepaskannya ke dalam sirkulasi. Hal tersebut dibuktikan pada percobaan yang dilakukan pada mencit transgenik yang mengekspresikan IL-5 didapatkan jumlah eosinofil yang meningkat (eosinofilia) pada sirkulasi, akan tetapi tidak pada jaringannya. Hal tersebut mengindikasikan bahwa migrasi eosinofil dari sirkulasi ke jaringan diatur secara terpisah oleh sekelompok pengontrol yaitu CC kemokin yang menyebabkan kemotaksis beberapa jenis leukosit. Khusus eosinofil CC kemokin tersebut ada 2 macam yang biasa disebut eotaxin1 dan eotaxin 2.<sup>31</sup>

Reseptor eotaxin pada eosinofil ini disebut CCR3 yang merupakan anggota dari keluarga reseptor. Reseptor ini juga mengikat CC kemokin yang lain seperti *Membran cofactor of proteolysis* (MCP)-3, MCP-4 dan RANTES yang juga menginduksi kemotaksis eosinofil. Dengan cara yang sama kemokin ini juga dapat menstimulasi degranulasi sel mast dan basofil.<sup>31</sup>

## 2.6. Pemeriksaan Eosinofil

Eosinofil darah tepi bisa dihitung secara kuantitatif dengan berbagai cara misalnya hitung jenis eosinofil dengan pengecatan Giemsa atau dengan pemeriksaan eosinofil absolut, bisa juga dihitung dengan pengecatan cara Dacie. Sedangkan jumlah eosinofil pada cairan peritoneum bisa diperiksa dengan menambahkan trypan blue, PBS dan heparin pada cairan intraperitoneal, dengan pengecatan My-Grunwald-Giemsa. Kendala pemeriksaan dari pemeriksaan selain menggunakan hitung jenis eosinofil adalah penggunaan sampel (darah/ cairan intra peritoneal) segar yang langsung dicampur dengan reagen dan harus segera diperiksa menggunakan hemositometer sehingga tidak dapat disimpan lama untuk pemeriksaan kemudian hari. Selain itu gambaran morfologi eosinofil paling mudah dikenali adalah dengan menggunakan pengecatan Giemsa pada pemeriksaan hitung jenis eosinofil, dengan pengecatan lain morfologi eosinofil lebih sulit dikenali <sup>38</sup>

## 2.7. Ovalbumin Sebagai Alergen

Ovalbumin (OVA) merupakan protein utama yang berasal dari putih telur berupa glikoprotein dengan berat molekul 45.000 dalton. Molekulnya terdiri dari polipeptida dengan dua atau lebih gugus fosfat dengan rantai manosa dan residu glikosamin.<sup>20</sup>

Sensitisasi dengan ovalbumin baik secara inhalasi, oral maupun intraperitoneal terbukti dapat merubah kecenderungan respon imun mencit ke arah  $T_H2$ . Hal tersebut telah dibuktikan pada banyak penelitian.<sup>20,21,22, 39</sup>

Kang B dkk (1999), membuktikan bahwa dengan pemberian ovalbumin secara oral dengan dosis 2,5 – 250 mg pada tikus BALB/c selama 4 minggu menyebabkan terjadinya toleransi respon imun tikus bertahan ke arah  $T_H2$  dominan setelah 26 minggu meskipun respon imun terhadap  $T_H1$  juga terbentuk.<sup>20</sup>

Hal tersebut juga dibuktikan oleh Morokata T. dkk (2000), dimana BALB/c yang disensitisasi dengan OVA dosis tinggi (lebih dari 50 mikrogram) akan menyebabkan timbulnya sitokin  $T_H2$  yang ditandai dengan meningkatnya IL-4, IL-5 dan menurunnya IFN- $\gamma$ . Pada pemeriksaan paru – paru BALB/c tersebut didapatkan infiltrasi eosinofil dalam jumlah tinggi.<sup>38</sup>

Penelitian yang dilakukan Akiyama H. dkk (2001), membuktikan BALB/c yang diberi OVA peroral sebanyak 0.1 mg selama 9 minggu menunjukkan peningkatan produksi IgE spesifik terhadap OVA, peningkatan respon IgG1, peningkatan serum histamin, dan terjadi peningkatan ASA (*active systemic anaphylaxis*) yang terkait dengan histamin.<sup>21</sup>

Penelitian Saloga J. dkk (1993) membuktikan BALB/c yang disensitisasi OVA dengan cara inhalasi tiap hari selama 10 hari menunjukkan peningkatan serum IgE dan responsivitas jalan nafas. Apabila 2 hari kemudian BALB/c tersebut disuntikkan OVA secara intradermal kemudian dilakukan tes kulit akan terbentuk *wheal* yang berarti menunjukkan adanya reaksi hipersensitifitas cepat. Reaksi positif tersebut dihubungkan dengan adanya degranulasi sel mast. Apabila kelenjar limfe peribronkial BALB/c diatas ditransfer ke BALB/c yang lain yang belum disensitisasi OVA maka BALB/c resipien tersebut akan mengembangkan respon IgE spesifik terhadap OVA dan respon hipersensitifitas tipe cepat yang spesifik. Hal tersebut mengindikasikan jaringan limfoid

lokal pada tempat yang disensitisasi dapat mentransfer sifat responsif terhadap alergen.<sup>22</sup>

Saloga J. dkk (1993) juga membuktikan pada BALB/c yang diolesi OVA di kulitnya setelah 14 hari disensitisasi OVA juga menunjukkan adanya peningkatan antibodi IgE dan IgG1 yang spesifik terhadap OVA serta terjadi peningkatan total serum IgE. Dan secara invitro dapat juga terdeteksi.<sup>40</sup>

Penelitian yang dilakukan Bowman dan Holt (2001) membuktikan, mencit yang disensitisasi dengan OVA dalam buffer saline secara intraperitoneal, atau OVA dalam *incomplete Freund's adjuvant* secara subkutan atau OVA dalam *aluminium hydroxide* secara intraperitoneal sebanyak 100 ug, dalam 28 hari dilakukan pemeriksaan *skin test* didapatkan peningkatan respon DTH diukur dari pembengkakan dan penebalan kulit di sekitar telinga mencit setelah 24 jam dari dilakukannya *intradermal challenge* dengan OVA.<sup>40</sup>

Pemberian ovalbumin sebagai sensitisasi untuk merangsang respon alergi secara intraperitoneal banyak dilakukan pada banyak penelitian disebabkan pemberian OVA mudah dikontrol dosisnya dibandingkan dengan yang secara inhalasi dan oral.<sup>20</sup>



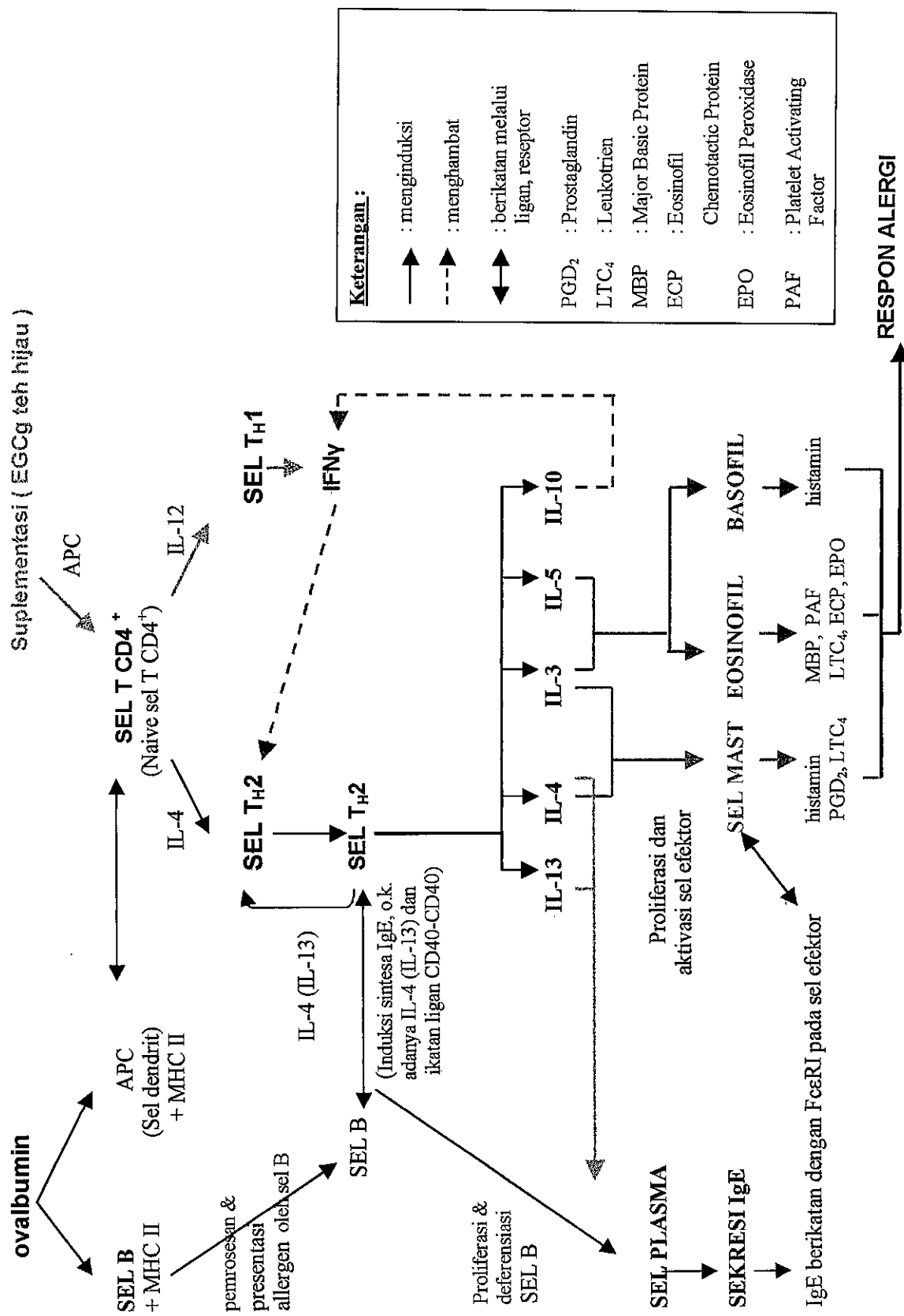
## **BAB III**

### **KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

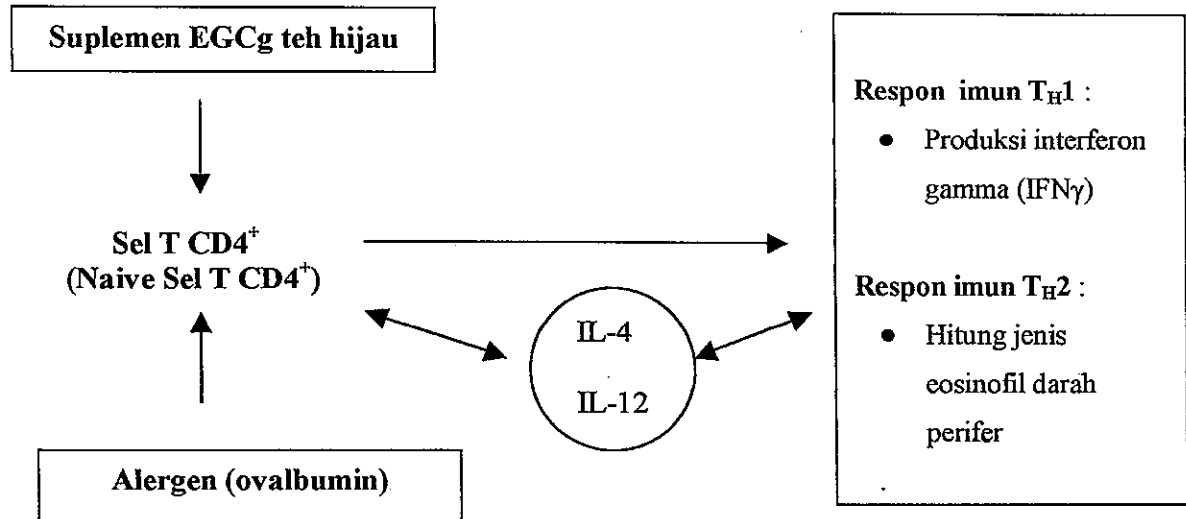
#### **3.1. Kerangka Teori**

( Pada halaman berikutnya )

### 3.1. Kerangka Teori



### 3.2. Kerangka Konsep



### 3.3. Keterbatasan Penelitian

Pemeriksaan eosinofil dengan sampel yang berasal dari darah tepi dengan menggunakan tehnik hitung jenis eosinofil memiliki keterbatasan, yaitu tidak dapat menilai jumlah eosinofil pada area yang terpapar alergen dalam hal ini adalah cairan peritoneum.

Peneliti tidak memakai tehnik pemeriksaan eosinofil dari cairan intraperitoneal karena pada penelitian pendahuluan penilaian morfologi eosinofil dari cairan intraperitoneal tidak dapat dikenali dengan jelas, sedangkan pemeriksaan hitung jenis eosinofil dari darah tepi dengan pengecatan giemsa gambaran morfologi eosinofilnya cukup jelas.

Peneliti pada penelitian ini tidak memakai pemeriksaan eosinofil absolut dengan menghitung total eosinofil karena penggunaan sampel (darah/ cairan intra peritoneal)

harus segar yang langsung dicampur dengan reagen dan harus segera diperiksa menggunakan hemositometer sehingga tidak dapat disimpan lama untuk pemeriksaan kemudian hari.

### **3.4. Hipotesis Penelitian**

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini

1. Terdapat peningkatan kadar interferon gamma pada kelompok mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin dan diberi EGCg teh hijau.
2. Terdapat penurunan jumlah eosinofil darah perifer pada kelompok mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin dan diberi EGCg teh hijau.

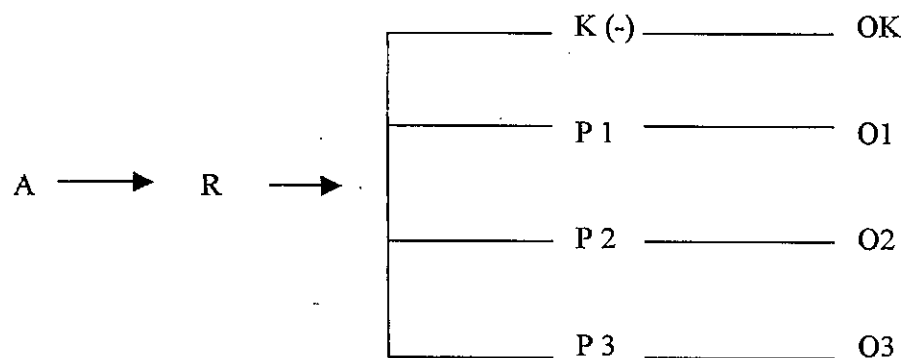
## BAB IV

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *The Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian. Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*Completely randomized design*), randomisasi sederhana dilakukan dengan komputer. Perlakuan adalah dengan pemberian ovalbumin (OVA) secara intraperitoneal dan *Epigallocatechin gallate* (EGCg) teh hijau pada mencit. Sedangkan keluarannya (*outcome*) berupa perubahan respon imun *naive* sel T CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>0) ke arah T<sub>H</sub>1 dominan yang dilihat dari produksi interferon gamma (IFN-γ) dan hitung jenis eosinofil darah perifer.

Mencit yang telah menjalani adaptasi selama 1 minggu dibagi menjadi 4 kelompok secara acak masing-masing 6 ekor, yaitu:



**Keterangan:**

A → R: masa adaptasi selama 1 minggu

- R : Randomisasi
- K : Kontrol, dipakai sebagai pembanding. Mencit hanya mendapat pakan standar, tidak disensitisasi dengan ovalbumin dan tidak diberi suplementasi EGCg.
- P1 : Perlakuan 1, mencit mendapat pakan standar, disensitisasi OVA dengan dosis 100 ug OVA dalam 0,1ml alum adjuvant intraperitoneal pada hari pertama, kemudian di booster lagi dengan OVA dalam alum adjuvant i.p. pada hari ke 14 dengan dosis yang sama dan **tidak diberi EGCg.**
- P2 : Perlakuan 2, mencit mendapat pakan standar, disensitisasi OVA dengan dosis 100 ug OVA dalam 0,1 ml alum adjuvant intraperitoneal pada hari pertama, kemudian di booster lagi dengan OVA dalam alum adjuvant i.p. pada hari ke 14 dengan dosis yang sama dan **diberi EGCg peroral sebanyak 0,5 mg /hari / mencit selama 28 hari (hari 1 s/d hari 28)**
- P3 : Perlakuan 3, mencit mendapat pakan standar, disensitisasi OVA dengan dosis 100 ug OVA dalam 0,1 ml alum adjuvant intraperitoneal pada hari pertama, kemudian di booster lagi dengan OVA dalam alum adjuvant i.p. pada hari ke 14 dengan dosis yang sama dan **diberi EGCg peroral sebanyak 2 mg / hari / mencit selama 28 hari (hari 1 s/d hari 28)**
- OK : Pengamatan pada mencit kelompok kontrol
- O1 : Pengamatan pada mencit dengan perlakuan 1
- O2 : Pengamatan pada mencit dengan perlakuan 2
- O3 : Pengamatan pada mencit dengan perlakuan 3

## 4.2. Populasi Dan Sampel

### 4.2.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit strain BALB/c usia 6 minggu. Strain mencit yang dipilih adalah BALB/c sebab mencit BALB/c pada umur 6 – 12 minggu dilaporkan dapat menimbulkan reaksi alergi (ditandai dengan eosinofilia) apabila mencit tersebut disensitisasi dengan ovalbumin.

Penentuan jenis kelamin mencit yang dipakai pada penelitian ini perlu dilakukan karena hormon estrogen, progesteron dan testoteron dapat mempengaruhi respon imunitas. Pada mencit yang berumur 7 minggu telah terjadi stadium ovulasi yang waktunya berbeda antara mencit yang satu dengan mencit yang lain sehingga rasio kadar estrogen dan progesteron pada tiap mencit berbeda-beda. Oleh karena itu pada penelitian ini dipilih mencit dengan jenis kelamin jantan.

### 4.2.2. Sampel

#### 4.2.2.1. Besar sampel

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan derajat bebas *error* sebesar 15. Jumlah unit percobaan 4 dengan ulangan masing-masing 6 untuk setiap unit.

Ulangan ditentukan menurut rumus :

$$r = 1 + \frac{15}{(t-1)} \quad \text{yang diturunkan dari rumus } (t-1)(r-1) \geq 15$$

**Keterangan:**

- r : jumlah ulangan  
t : jumlah perlakuan

Jadi jumlah seluruh mencit yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor.

**4.2.2.2. Cara Pengambilan sampel**

Sampel diambil dari mencit yang secara genetis sifatnya sama, maka pengambilan secara random atau tidak, tidak menjadi masalah. Untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan, maka pengelompokan sampel dilakukan secara acak.

Sebelum diberikan perlakuan, mencit diadaptasikan dulu selama 1 minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Setelah menjalani masa adaptasi mencit dibagi menjadi 4 kelompok secara acak.

**4.3. Variabel dan Definisi Operasional Variabel Penelitian****4.3.1 Variabel Bebas**

Sebagai variabel bebas dalam penelitian ini adalah :

1. Pemberian *Epigallocatechin gallate* (EGCg) teh hijau sebagai imunomodulator.

*Epigallocatechin gallate* yang dipakai adalah EGCg yang berasal dari teh hijau yang diperoleh dari Sigma-Aldrich Pte.Ltd.

Dosis yang dipakai adalah 0,5 mg/hari/oral/ mencit dan 2 mg/hari/oral/mencit



2. Pemberian ovalbumin (OVA) dalam alum adjuvant intraperitoneal sebagai sensitisasi.

Ovalbumin yang dipakai berasal dari *albumin chicken egg grade V* yang diperoleh dari Sigma-Aldrich Pte.Ltd. Alum adjuvant diperoleh dari Sigma-Aldrich Pte.Ltd

Dosis OVA yang dipakai adalah 100 ug / 0,1 ml alum i.p

#### **4.3.2. Variabel Tergantung**

Variabel Tergantung pada penelitian ini adalah :

1. Kadar IFN- $\gamma$  yang diperiksa dari limpa.

Diperiksa dengan metode ELISA, satuannya pg/ml

2. Hitung jenis eosinofil darah perifer

Dihitung dengan memakai metode hitung jenis leukosit, satuannya jumlah eosinofil / 100 leukosit.

#### **4.3.3. Definisi Operasional Variabel Penelitian**

**Tabel 1**  
**Variabel dan Definisi Operasional**

Variabel	Definisi Operasional	Skala	Satuan
<b>Variabel Bebas</b>			
Pemberian EGCg teh hijau sebagai imunomodulator	EGCg merupakan komponen aktif dan terbanyak dari teh hijau yang dapat dipakai untuk memodulasi sistem imun.	Nominal	-
Pemberian OVA sebagai adjuvant	OVA merupakan protein utama putih telur berupa glikoprotein yang dapat merubah kecenderungan respon imun mencit ke arah T <sub>H</sub> 2	Nominal	-
<b>Variabel tergantung</b>			
Kadar interferon gamma	Kadar interferon gamma dalam supernatan limfosit yang telah diinkubasi selama 3 X 24 jam diukur dengan metode ELISA	Rasio	pg/ml
Jumlah Eosinofil	Jumlah eosinofil dihitung dengan hitung jenis leukosit ( <i>Differential counting Leukocyte</i> ).	Rasio	per 100 leukosit

#### 4.4. Tempat Dan Waktu Penelitian

- Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang, pada bulan September - Desember 2002.
- Pengolahan bahan yang akan diteliti dilakukan di Laboratorium Bioteknologi FK UNDIP Semarang.
- Pemeriksaan hasil penelitian (interferon gamma) dilakukan di Laboratorium PAU Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

#### 4.5. Bahan dan Materi Penelitian.

- Mencit strain BALB/c umur 6 minggu, diperoleh dari Pusvetma (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya, dengan :  
Kriteria inklusi : mencit betina strain BALB/c, umur 6 minggu, sehat dan tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak.  
Kriteria eksklusinya adalah : mencit tampak sakit (tidak aktif) serta tampak adanya abnormalitas anatomis.
- Darah perifer dari mencit strain BALB/c yang diteliti.
- Limpa dari mencit strain BALB/c yang diteliti.
- Ovalbumin dalam alum adjuvant diperoleh dari Sigma-Aldrich Pte.Ltd
- *Epigallocatechin gallate* (EGCg) teh hijau didapat dari Sigma-Aldrich Pte.Ltd
- Reagen interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) diperoleh dari R and D Netherland.

#### 4.6. Alat / Instrumen Penelitian

- 24 buah kandang hewan coba individual
- Kanul mulut
- Mikroskop cahaya
- Object glass
- Kit IFN-g.
- Sduit disposable
- Tabung reaksi
- Pinset
- Timbangan
- ELISA reader

#### 4.7. Prosedur Pengumpulan Data

- 24 ekor mencit jantan strain BALB/c, umur 6 minggu, diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standar selama 1 minggu *ad libitum*.
- 24 ekor mencit tersebut kemudian dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing 6 ekor yang ditentukan secara acak. Masing – masing kelompok dikandangkan secara individual.
- Masing – masing kelompok mendapatkan pakan standar yang sama.
- **Kelompok perlakuan pertama**, mencit mendapat pakan standar, pada hari pertama mencit disensitisasi dengan OVA dalam alum adjuvant dengan dosis 100 ug /0,1 ml alum intraperitonel, kemudian di booster lagi dengan OVA dalam alum adjuvant pada hari ke 14 dengan dosis 100ug /0,1 ml alum i.p. Pada hari ke 29 dilakukan pengambilan sampel dari darah tepi dan limpa mencit.
- **Kelompok perlakuan kedua**, mencit selain mendapat pakan standar, juga diberi EGCg peroral sebanyak 0,26 mg /hari/ mencit selama 28 hari (hari 1 s/d

hari 28) dan disensitisasi dengan OVA dalam alum adjuvant pada hari pertama dengan dosis 100 ug /0,1 ml alum intraperitonel, kemudian di booster lagi dengan OVA dalam alum adjuvant pada hari ke 14 dengan dosis 100 ug /0,1 ml alum i.p.

Pada hari ke 29 dilakukan pengambilan sampel dari darah tepi dan limpa mencit.

- **Kelompok perlakuan ketiga**, mencit selain mendapat pakan standar, juga diberi EGCg peroral sebanyak 2 mg / hari / mencit selama 28 hari (hari 1 s/d hari 28) dan disensitisasi dengan OVA dalam alum adjuvant pada hari pertama dengan dosis 100 ug /0,1 ml alum intraperitonel, kemudian di booster lagi dengan OVA dalam alum adjuvant pada hari ke 14 dengan dosis 100ug /0,1 ml alum i.p.

Pada hari ke 29 dilakukan pengambilan sampel dari darah tepi dan limpa mencit.

- Darah tepi diambil dari ekor mencit untuk hitung jenis eosinofil.
- Limpa diambil untuk diperiksa kadar IFN- $\gamma$

#### **4.8. Penentuan Dosis *Epigallocatechin gallate* (EGCg)**

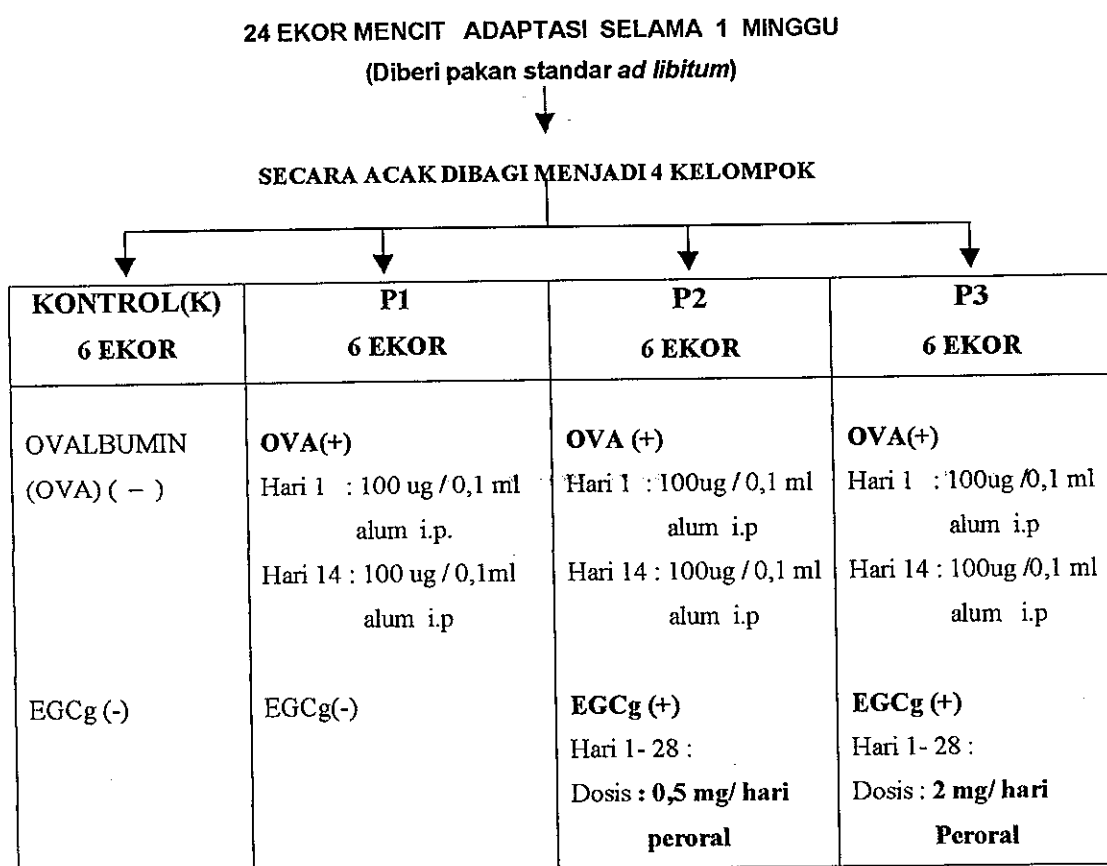
Dosis EGCg yang dipakai berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Chow HH (2001) dimana dalam penelitiannya dosis terendah EGCg yang dipakai adalah 200mg per oral dan dosis tertinggi adalah 800 mg per oral. Subyek yang diteliti adalah manusia.<sup>24</sup>

Pada penelitian ini peneliti memakai mencit BALB/c sehingga dosis EGCg dikonversikan untuk dosis mencit sesuai dengan perhitungan dosis yang dilakukan oleh

Laurence & Bacharah (1964). Angka konversi dosis mencit dengan berat 20 g adalah 0,0026, jadi dosis EGCg yang diberikan :

- Dosis terendah :  $0,0026 \times 200 \text{ mg} = 0,52 \text{ mg} \approx 0,5 \text{ mg}$
- Dosis tertinggi :  $0,0026 \times 800 \text{ mg} = 2,08 \text{ mg} \approx 2 \text{ mg}$

#### 4.9. Alur Kerja.



**DIPERIKSA :**

**Pada hari ke 29 :**

- Darah perifer : Jumlah eosinofil / 100 leukosit ( hitung jenis leukosit)
- Limpa : Kadar IFN- $\gamma$  ( metode ELISA )

## **4.10. Pemeriksaan**

### **4.10.1. Pemeriksaan Kadar Interferon gamma**

#### **4.10.1.1. Prosedur Kultur Splenosit**

##### **Alat :**

1. Pemananas alkohol
2. Beaker glass volume 50-75 cm
3. gunting
4. pinset
5. petri disk plastik
6. refrigerated centrifuge
7. pipet pasteur
8. laminar flow hood

##### **Bahan :**

1. Sodium penthobarbiol
2. ethanol 70 % v/v
3. free Hank's Balance d salf solution (CMF-GBSS)
4. lysing buffer (NH<sub>4</sub>Cl 0,17 M)
5. Roxwell Park Memorial Institute (RPMI) 1640
6. Fetal Bovine Serum (FBS)
7. Glutamin
8. Penicillin streptomycin

**Prosedur :**

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi vertebra servikal atau inhalasi dengan pentobarbitol, dibaringkan terlentang dan seluruh permukaan ventral disemprot dengan ethanol 70 %
2. Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen, robek kulit menggunakan 2 pinset ke arah kepala dan ekor mencit, sehingga kulit terkelupas dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan ethanol 70 % untuk menyingkirkan bulu-bulu yang rontok.
3. Peritoneum dilipat ke atas, angkat limpa menggunakan pinset. Pisahkan limpa dari pembuluh darah dan jaringan sekitarnya menggunakan gunting. Letakkan limpa pada petri dish berisi 1,5 ml HBSS.
4. Hancurkan limpa dengan menggunakan pinset.
5. Gunakan pipet Pasteur untuk memindahkan suspensi sel ke tabung pemusing. Biarkan sel-sel yang mengumpul mengendap selama 5 menit.
6. Pindahkan suspensi sel ke tabung yang lain dan pusingkanlah sel pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C . Pelet yang didapat diresuspensikan dalam 2 ml lysing buffer pada suhu ruangan ( 25 °C ) untuk melisiskan eritrosit, lalu pusingkan pada kecepatan 200xg selama 10 menit pada suhu 4°C.
7. Buang supernatan dan peller dicuci 2x menggunakan RPMI dengan cara dipipet berulang-ulang dan dipusingkan dengan kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C.
8. Hitung sel-sel menggunakan hemocytometer.



9. Pada 1 limpa kira-kira didapatkan  $1 \times 10^6$  sel splenosit dalam 3 cc RPMI

10. Kemudian tiap sumuran diberi PHA dengan ukuran 10 ug/ml selama 3 hari.

Supernatan limfosit yang telah diinkubasi selama 3 X 24 jam diukur kadar interferon gammanya dengan metode ELISA. Dalam

#### **4.10.1.2. Prosedur Pemeriksaan Interferon gamma.**

Reagen ( kit ) yang tersedia dari R and D Netherland :

1. Microplate berlapis Ab monoklonal spesifik terhadap IFN- $\gamma$  mencit
2. Konjugat IFN- $\gamma$  mencit
3. Pengencer konjugat IFN- $\gamma$  mencit
4. Kontrol IFN- $\gamma$  mencit.
5. Cairan pengencer sampel
6. Pengencer kalibrator
7. Buffer pencuci
8. Reagen pewarna A dan B
9. Stop solution

#### **Persiapan Reagen :**

1. Pembuatan kontrol :

Larutkan kontrol (pada kit) dengan H<sub>2</sub>O deionisasi.

2. Pembuatan konjugat :

Tambahkan 0,5 ml konjugat dengan 11 ml pengencer konjugat pada tabung steril.

3. Pembuatan buffer :

Tambahkan 25 ml buffer pencuci pada 600 ml H<sub>2</sub>O deionisasi

4. Larutan substrat :

Campurkan reagen pewarna A dan B dalam volume sama

5. Pembuatan standar :

Larutkan standar dengan 2ml pengencer kalibrator, menghasilkan konsentrasi larutan stok standar IFN- $\gamma$  3000pg/ml

6. Pengencer standar :

Masukkan 400 ul pengencer kalibrator pada tabung dan tambahkan 100 ul larutan stok standar IFN- $\gamma$  3000pg/ml, untuk mendapatkan konsentrasi IFN- $\gamma$  600 pg/ml. Buat pengenceran bertingkat.

**Prosedur Pemeriksaan :**

1. Siapkan reagen, sampel dan standar sesuai petunjuk
2. Siapkan microplate
3. Tambahkan 50ul cairan pengencer pada tiap sumuran
4. Tambahkan 50 ul cairan standar, kontrol, atau sampel pada tiap sumuran.  
Campur dengan cara mengetuk plate perlahan selama 1 menit. Tutup microplate, inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang
5. Aspirasi tiap sumuran dan cuci sumuran tersebut dengan buffer pencuci. Ulangi pencucian 4 kali. Setelah pencucian terakhir, buang semua buffer pencuci dengan cara aspirasi atau membalikkan microplate pada kain bersih

6. Tambahkan 100 ul cairan konjugat pada tiap sumuran. Tutup microplate dan inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang.
7. Ulangi aspirasi (sesuai tahap 5)
8. Tambahkan 100 ul cairan substrat pada tiap sumuran. Inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Jangan terkena cahaya langsung.
9. Tambahkan 100 ul stop solution pada tiap sumuran. Campur dengan cara mengetuk plate perlahan.
10. Periksa absorbansi dengan menggunakan microplate reader dengan absorbansi 450 nm dalam 30 menit.

#### **4.10.2. Pemeriksaan Jumlah Eosinofil**

Pemeriksaan eosinofil dilakukan dengan memakai hitung jenis leukosit (*differential counting leukocyte*) dengan pewarnaan giemsa. Pada hitung jenis leukosit, eosinofil dihitung per 100 leukosit.

#### **Pembuatan Sediaan Hapus Darah**

1. Sediakan kaca obyek yang kering, bebas debu dan bebas lemak. Untuk menggeserkan darah pada kaca obyek dipakai kaca obyek yang lain yang sisi pendeknya rata sekali.
2. Sentuhlah tanpa menyentuh kulit setetes darah kecil (garis tengah tidak melebihi 2 mm) dengan kaca obyek, kira-kira 2 cm dari ujungnya dan letakkan kaca itu di atas meja dengan tetes darah di sebelah kanan.

3. Dengan tangan kanan letakkan kaca obyek yang lain di sebelah kiri tetes darah tadi dan digerakkan ke kanan hingga mengenai tetes darah.
4. Tetes darah akan menyebar pada sisi kaca penggeser itu. Tunggulah sampai darah itu menyampai titik kira-kira 0,5 cm dari sudut kaca penggeser.
5. Segeralah geserkan kaca itu ke kiri sambil memegangnya miring dengan sudut antara 30 – 45 derajat. Janganlah menekan kaca penggeser itu ke bawah.
6. Biarkan sediaan itu kering di udara.
7. Beri label pada preparat tersebut.

#### **Pewarnaan Sediaan Hapus Darah**

1. Letakkan sediaan yang akan dipulas di atas rak tempat memulas dengan lapisan darah ke atas.
2. Teteskan sekian banyak metil alkohol keatas sediaan, sehingga bagian yang terlapis darh tertutup seluruhnya. Biarkan selama 5 menit atau lebih lama.
3. Tuanglah kelebihan metil alkohol dari kaca.
4. Liputilah sediaan itu dengan Giemsa yang telah diencerkan dengan larutan penyanggah dan biarkan selama 20 menit.
5. Bilaslah dengan air suling.
6. Letakkan sediaan dalam sikap vertikal dan biarkan menering pada udara.



#### 4.11. Analisis Data

Semua hasil yang didapatkan dicatat dan dilakukan analisis data. Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Untuk menguji kenormalan data dilakukan uji Kolmogorov – Smirnov. Apabila distribusi datanya normal maka dilakukan uji dengan *one way Anova* kemudian dilanjutkan dengan *Post hoc test* apabila ada perbedaan. Semua uji statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS 7.5 for Window

## **BAB V**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **5.1. Hasil Pengumpulan Data**

Respon alergi mencit pada penelitian ini dilihat berdasarkan kadar interferon- $\gamma$  dan hitung jenis eosinofil / 100 leukosit dari darah tepi.

Dari 24 ekor mencit BALB/c yang dipakai sebagai hewan coba, sampai hari terakhir dilakukannya penelitian semua mencit dalam keadaan hidup. Kemudian dari tiap ekor mencit tersebut diambil limpa dan darah hapus dari ekornya. Data diperoleh dari limpa yang dibuat menjadi supernatan limfosit kemudian diukur dengan metode ELISA dan darah hapus dari ekor mencit untuk melihat hitung jenis eosinofil per 100 leukosit.

#### **5.2. Karakteristik Sampel**

Sampel dari penelitian ini sebanyak 24 ekor mencit diambil dari mencit strain BALB/c usia 6 minggu yang secara genetis sifatnya sama. Untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan, maka pengelompokan sampel dilakukan secara acak.

### 5.3. Kadar Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )

#### 5.3.1. Analisis Data Kadar Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )

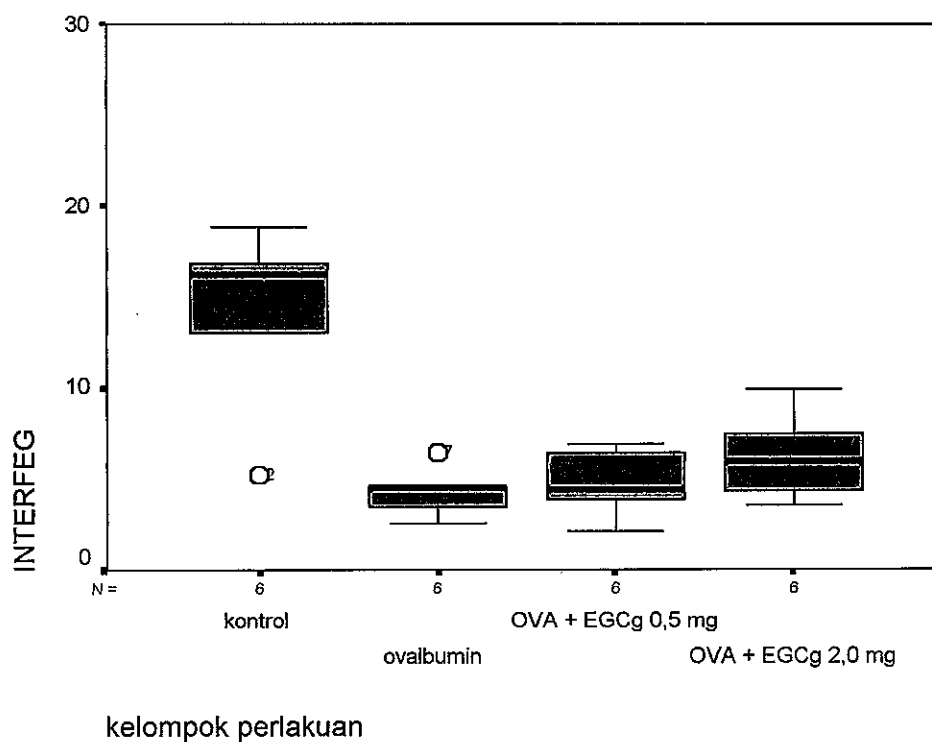
Rerata kadar IFN- $\gamma$  secara keseluruhan pada penelitian ini sebesar 7,4 pg/ml dengan simpangan baku 4,9, sedangkan kadar IFN-  $\gamma$  pada masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Kadar Interferon gamma (IFN-  $\gamma$ )**

Kelompok Perlakuan	Kadar IFN- $\gamma$	n
K : OVA (-), EGCg (-)	$14,4 \pm 4,9$	6
P1 : OVA (+), EGCg (-)	$4,3 \pm 1,3$	6
P2 : OVA (+), EGCg 0,5 mg/hari/oral	$4,6 \pm 1,8$	6
P3 : OVA (+), EGCg 2,0 mg/hari/oral	$6,1 \pm 2,2$	6

Kadar IFN- $\gamma$  pada kelompok kontrol (K) menunjukkan rerata yang paling tinggi ( $14,4 \pm 4,86$ ). Pada mencit yang diberi OVA dan EGCg 2,0 mg /hari/oral (P3) diperoleh rerata IFN-  $\gamma$  yang sedikit lebih tinggi dibandingkan kelompok mencit yang diberi OVA saja (P1) maupun kelompok mencit yang diberi OVA dan EGCg 0,5 mg/hari/oral (P2).





Gambar 2. Grafik Boxplot kadar IFN- $\gamma$  pada tiap kelompok perlakuan .

Gambar 2 menunjukkan median kelompok kontrol berbeda jauh dengan kelompok yang diberi OVA saja (P1), kelompok OVA + EGCg 0,5 mg (P2) dan kelompok OVA + EGCg 2 mg (P3). Sedangkan median kelompok OVA saja (P1) hampir sama dengan median kelompok OVA + EGCg 0,5 mg (P2) maupun kelompok OVA + EGCg 2 mg (P3)

Sebelum melakukan uji beda statistik lebih lanjut, dilakukan terlebih dahulu uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat normalitas distribusi data kadar IFN- $\gamma$ . Hasil uji menunjukkan bahwa  $p = 0,101$ , yang berarti menunjukkan distribusi data kadar IFN- $\gamma$  normal, sehingga dimungkinkan menggunakan uji *one way anova*. Hasil *one way anova* menunjukkan terdapat perbedaan rerata kadar IFN- $\gamma$  yang bermakna di antara keempat

kelompok tersebut ( $F = 15,967$ ;  $p < 0,001$ ). Setelah diketahui bahwa ada perbedaan yang bermakna di antara empat kelompok, selanjutnya dilakukan *Post Hoc Test* (test LSD) untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda.

Hasil test LSD didapatkan rerata kadar IFN- $\gamma$  kelompok kontrol (K) berbeda bermakna ( $p < 0,001$ ) dengan ketiga kelompok yang diberi perlakuan (P1, P2, P3). Sedangkan di antara ketiga kelompok yang diberi perlakuan (P1, P2, P3) tidak menunjukkan perbedaan bermakna rerata kadar IFN-  $\gamma$ . Hasil test LSD selengkapnya dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil Test LSD Kadar IFN-  $\gamma$**

Kelompok	Kontrol	P1	P2	P3
Kontrol	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
P1	$p < 0,001$	-	0,848	0,291
P2	$p < 0,001$	0,848	-	0,384
P3	$p < 0,001$	0,291	0,384	-

### 5.3.2. Pembahasan Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )

Penelitian ini mendapatkan perbedaan yang bermakna kadar IFN- $\gamma$  pada kelompok kontrol (K) dibandingkan dengan kelompok yang diberikan perlakuan (P1, P2, P3), hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian OVA pada kelompok perlakuan menyebabkan penurunan kadar IFN- $\gamma$ . Penurunan kadar IFN- $\gamma$  pada kelompok perlakuan tersebut membuktikan bahwa BALB/c pada kelompok perlakuan telah

mengalami alergi atau dengan kata lain respon imunnya telah bergeser ke arah  $T_H2$  dominan, dimana OVA yang merupakan protein utama putih telur secara intraperitoneal mampu merubah kecenderungan respon imun mencit ke arah  $T_H2$ . Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Morokota T.,dkk (2000), dimana BALB/c yang disensitisasi dengan OVA dosis tinggi (lebih dari 50 mikogram) akan menyebabkan timbulnya sitokin  $T_H2$  yang ditandai dengan meningkatnya IL-4, IL-5 dan menurunnya IFN- $\gamma$ .<sup>39</sup>

Sedangkan tidak didapatkannya perbedaan yang bermakna peningkatan kadar IFN- $\gamma$  diantara kelompok perlakuan (P1, P2, P3) menunjukkan bahwa pemberian EGCg belum mampu meningkatkan kadar IFN- $\gamma$  pada mencit yang telah mengalami respon imun ke arah  $T_H2$  dominan (alergi), meskipun ada kecenderungan meningkat. Hal tersebut bisa dijelaskan oleh penelitian yang dilakukan oleh Tomita M. dkk (2002) dimana *catechin* dan pigmen teh (hasil oksidasi *catechin*) dapat menghambat sekresi IFN- $\gamma$ , ekspresi gen IFN- $\gamma$ , sekresi IL-2, ekspresi gen IL-2, dan aktivasi NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor- $\kappa$ B*) di limpa mencit yang kaya akan sel T  $CD4^+$ . NF-  $\kappa$ B sendiri merupakan faktor transkripsi yang terlibat dalam regulasi molekuler sejumlah inflamatori sitokin. Dimana sitokin inflamatori yang dihasilkan sel  $T_H1$  yaitu IL-2 dan IFN- $\gamma$  mengandung *functional NF- $\kappa$ B binding sites* di antara promoternya, yang merupakan target dari *catechin* dan pigmen teh. Akibat dihambatnya NF- $\kappa$ B tersebut oleh *catechin*, maka ekspresi gen IFN- $\gamma$  terhambat yang mengakibatkan produksi IFN- $\gamma$  terhambat.<sup>28</sup> Namun demikian *catechin* dan pigmen teh tidak hanya dapat menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B pada sitokin inflamatori yang dihasilkan oleh sel  $T_H1$ , ternyata *catechin* dan pigmen teh juga diketahui dapat menghambat ekspresi sitokin sel  $T_H2$  yaitu IL-4

dan IL-5 yang hanya sedikit mengandung *NF-κB* di promoternya. Jadi untuk melihat apakah *catechin* dan pigmen teh benar-benar berpengaruh terhadap penurunan IFN-γ melalui penghambatan aktivasi *NF-κB* masih perlu dibuktikan dengan cara melihat rasio perbandingan penurunan sitokin T<sub>H</sub>1 dan T<sub>H</sub>2 dalam hal ini IFN-γ dan IL-4.<sup>28</sup>

Tidak bermaknanya peningkatan kadar IFN-γ pada mencit yang diberi OVA dan EGCg pada penelitian di atas, dimungkinkan juga terjadi oleh karena adanya berbagai macam sitokin yang dihasilkan oleh sel T<sub>H</sub>2 itu sendiri, yang selain dapat memacu respon alergi seperti IL-4 dan IL-5 juga dihasilkan IL-10 yang merupakan sitokin antagonis dari IFN-γ.<sup>40</sup> IL-10 akan menghambat produksi IL-12 oleh sel makrofag yang berguna untuk menstimulasi produksi IFN-γ oleh sel T dan sel NK, akibatnya produksi IFN-γ akan terhambat.<sup>40</sup> Kemungkinan dihasilkannya IL-10 oleh sel T<sub>H</sub>2 tersebut menyebabkan produksi IFN-γ oleh sel T<sub>H</sub>1 yang dipacu EGCg tidak maksimal, meskipun ada kecenderungan peningkatan kadar IFN-γ pada tiap kelompok perlakuan (P1, P2, P3) meskipun secara statistik tidak bermakna (Gambar 2).

Kemungkinan masih adanya sitokin T<sub>H</sub>2 (IL-10) yang bisa menghambat produksi IL-12 yang berakibat terhambatnya produksi IFN-γ tersebut bisa dijelaskan oleh penelitian yang dilakukan Kang B (1999), dimana dalam penelitiannya Kang B membuktikan bahwa dengan pemberian ovalbumin oral dosis 2,5 – 250 mg pada mencit BALB/c selama 4 minggu menyebabkan toleransi respon imun mencit bertahan ke arah T<sub>H</sub>2 dominan selama 26 minggu meskipun respon imun T<sub>H</sub>1 juga terbentuk.<sup>20</sup>

Penelitian ini juga mendapatkan adanya sedikit peningkatan kadar IFN-γ pada kelompok mencit yang diberi OVA dan EGCg 2 mg /hari/oral (P3) dibandingkan kelompok mencit yang diberi OVA dan EGCg 0.5 mg /hari/oral (P2) meskipun tidak

bermakna secara statistik (Gambar 2). Adanya sedikit peningkatan kadar IFN- $\gamma$  pada kelompok P3 tersebut diduga disebabkan oleh tingginya kadar EGCg bebas dalam plasma dibandingkan dengan dosis EGCg yang lebih rendah pada kelompok P2, sehingga akan lebih lama memacu respon imun  $T_H1$ . Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Chow HH (2001) yang mengatakan pemberian EGCg dosis tinggi (800mg) secara signifikan meningkatkan kadar EGCg dalam plasma jika dibandingkan dosis yang rendah (200 mg dan 400 mg).<sup>25</sup> Adanya peningkatan kadar IFN $\gamma$  dengan pemberian EGCg teh hijau ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Matsunaga (2001).<sup>11</sup> Matsunaga dalam penelitiannya membuktikan bahwa EGCg teh hijau secara *in vitro* mampu menurunkan produksi IL-10, meningkatkan respon IL-12 dan meningkatkan produksi IFN- $\gamma$ .<sup>11</sup> Penelitian Matsunaga ini didukung juga oleh penelitian Katiyar (1999) yang membuktikan EGCg menyebabkan berkurangnya produksi IL-10, meningkatnya IL-12 dan meningkatnya IFN- $\gamma$ .<sup>4</sup>

Peningkatan kadar IFN- $\gamma$  pada penelitian ini, meskipun belum mencapai seperti yang diharapkan sesuai dengan penelitian yang dilakukan Matsunaga (2001) dan Katiyar (1999) didapatkan kecenderungan peningkatan kadar IFN- $\gamma$  pada mencit yang diberi dosis EGCg lebih tinggi. Kesimpulannya apabila mencit BALB/c diberikan dosis EGCg lebih tinggi dari 2 mg/hari dan durasi pemberiannya ditambah maka kemungkinan kadar IFN- $\gamma$  bertambah semakin besar. Penambahan dosis EGCg tersebut masih dimungkinkan karena menurut penelitian Gunawijaya F.A (1996) mengenai penentuan dosis letal (LD-50) ekstrak teh hijau menyebutkan bahwa LD-50 ekstrak teh hijau pada mencit strain C3H adalah 5,7 – 11, 0 gram /kg BB. Bila hasil ini diterapkan

pada mencit BALB/c dengan berat 20 g maka dosis maksimal yang bisa diberikan adalah 0,114 – 0,22 gram atau 114 – 220 mg.<sup>42</sup>

## 5.4. Eosinofil

### 5.4.1. Analisis Data Jumlah Eosinofil

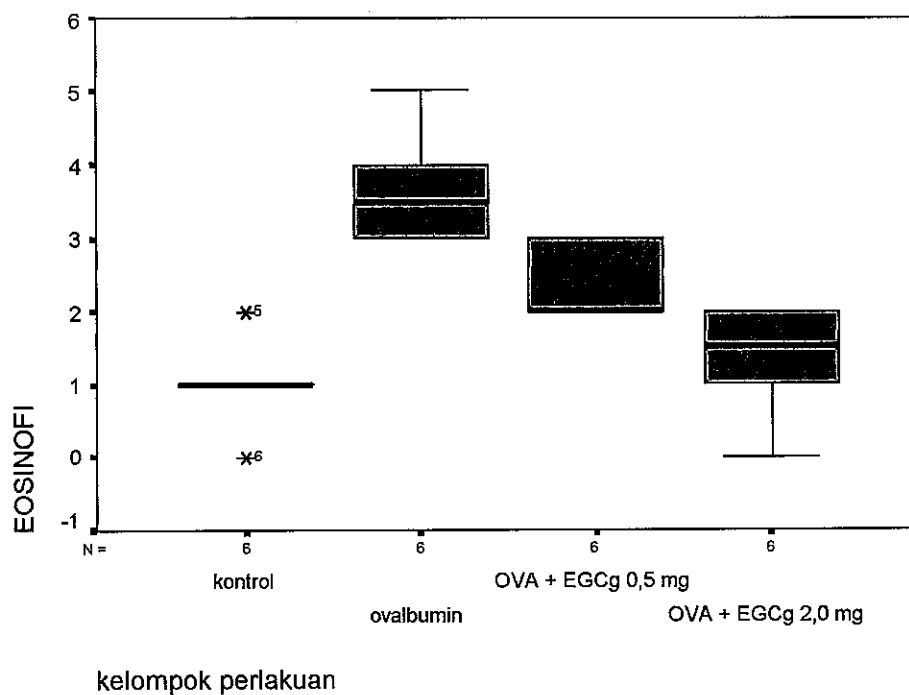
Pemeriksaan hitung jenis (*differential counting*) eosinofil / 100 leukosit pada penelitian ini didapatkan rerata secara keseluruhan sebesar 2,1 / 100 leukosit dengan simpangan baku 1,24, sedangkan jumlah eosinofil / 100 leukosit pada masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Jumlah Eosinofil per 100 Leukosit**

Kelompok Perlakuan	Eosinofil (per 100 leukosit)	N
K : OVA (-), EGCg (-)	$1,0 \pm 0,6$	6
P1 : OVA (+), EGCg (-)	$3,6 \pm 0,8$	6
P2 : OVA (+), EGCg 0,5 mg/hari/oral	$2,3 \pm 0,5$	6
P3 : OVA (+), EGCg 2,0 mg/hari/oral	$1,3 \pm 0,8$	6

Jumlah eosinofil pada kelompok P1 menunjukan rerata yang paling tinggi ( $3,6 \pm 0,8$ ) dibandingkan ketiga kelompok yang lain (K, P2, P3). Pada mencit yang diberi OVA dan EGCg 2,0 mg /hari/oral (P3) diperoleh rerata jumlah eosinofil / 100 leukosit yang sedikit lebih rendah dibandingkan kelompok mencit yang diberi OVA dan EGCg

0,5 mg /hari/oral (P2). Rerata jumlah eosinofil pada kelompok P1, P2 dan P3 lebih besar dibandingkan kelompok kontrol (K).



Gambar 3. Grafik Boxplot Jumlah eosinofil per 100 lekosit pada setiap kelompok Perlakuan

Median kelompok kontrol terlihat berbeda jauh dengan kelompok yang diberi OVA saja (P1) dan kelompok OVA + EGCg 0,5 mg (P2), namun hampir sama dengan kelompok OVA + EGCg 2 mg (P3). Sedangkan median kelompok yang diberi OVA saja (P1) berbeda jauh dengan kelompok yang diberi OVA + EGCg 0,5 mg (P2) maupun kelompok OVA + EGCg 2 mg (P3)

Sebelum melakukan uji beda statistik lebih lanjut, dilakukan terlebih dahulu uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat normalitas distribusi data rerata jumlah eosinofil / 100 leukosit. Hasil uji menunjukkan bahwa  $p = 0,331$ , yang berarti menunjukkan distribusi data rerata jumlah eosinofil / 100 leukosit normal, sehingga dimungkinkan menggunakan uji *one way anova*. Hasil *one way anova* menunjukkan terdapat perbedaan rerata jumlah eosinofil / 100 leukosit yang bermakna di antara keempat kelompok tersebut ( $F = 17,222$ ;  $p < 0,001$ ). Setelah diketahui bahwa ada perbedaan yang bermakna di antara empat kelompok, selanjutnya dilakukan *Post Hoc Tests* (test LSD) untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda.

Hasil test LSD didapatkan rerata jumlah eosinofil / 100 leukosit pada kelompok perlakuan yang diberi OVA saja (P1) berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ) dengan ketiga kelompok lainnya (kelompok K, P2 dan P3). Hasil test LSD selengkapnya dapat dilihat pada tabel 5.

**Tabel 5. Hasil test LSD jumlah eosinofil per 100 leukosit**

Kelompok	Kontrol	P1	P2	P3
Kontrol	-	$P < 0,001$	0,004	0,424
P1	$p < 0,001$	-	0,004	$p < 0,001$
P2	0,004	0,004	-	0,024
P3	0,424	$p < 0,001$	0,024	-



#### 5.4.2. Pembahasan Eosinofil

Penelitian ini mendapatkan perbedaan yang bermakna rerata jumlah eosinofil / 100 leukosit pada keempat kelompok (K, P1, P2, P3), hal tersebut membuktikan bahwa pemberian OVA dan EGCg berpengaruh terhadap jumlah eosinofil darah perifer mencit BALB/c.

Jumlah eosinofil yang ditemukan pada kelompok yang diberi OVA saja (P1) tidak mencapai jumlah eosinofil yang dapat dikategorikan alergi ( $> 2-4\%$ ).<sup>43</sup> Tidak didaptkannya jumlah eosinofil sampai dengan jumlah yang dapat dikategorikan sebagai alergi pada kelompok P1 tersebut bisa terjadi disebabkan oleh pendeknya masa hidup eosinofil di dalam sirkulasi yaitu sekitar 8 – 12 jam untuk kemudian masuk ke dalam jaringan.<sup>44</sup> Selain itu menurut Weller (1996) jumlah eosinofil di dalam sirkulasi dipengaruhi oleh keadaan diurnal dimana jumlah eosinofil paling tinggi terjadi pada malam hari dan terendah pada pagi hari dimana kadar glukokortikoid endogen meningkat.<sup>45</sup> Penurunan jumlah eosinofil dalam sirkulasi ternyata juga dipengaruhi oleh adanya glukokortikoid eksogen, produksi glukokortikoid endogen, stress, infeksi virus dan bakteri.<sup>44</sup>

Kelompok perlakuan P1 dimana mencit diberi OVA dosis 100 ug / 0,1 ml alum adjuvant didapatkan jumlah eosinofil / 100 leukosit yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok P2 dan P3 yang selain diberi OVA juga diberi EGCg (gambar 3) dan perbedaan tersebut secara statistik bermakna (Tabel 5), hal tersebut dapat membuktikan bahwa dengan pemberian OVA, mencit ada kecenderungan mengalami alergi dilihat dari jumlah eosinofil yang ada di sirkulasi. Selain itu dari penelitian ini juga dapat

dibuktikan terjadinya aktivasi sel  $T_H2$  pada mencit yang diberi OVA saja (P1) dilihat dari penurunan kadar  $IFN-\gamma$ . Dimana apabila sel  $T_H2$  teraktifasi maka sitokin seperti IL-5 akan dilepaskan dan hal tersebut dapat meningkatkan produksi eosinofil di sumsum tulang untuk kemudian dilepaskan ke dalam sirkulasi.<sup>31</sup> Menurut Rafeul Alam (2000) adanya satu eosinofil di dalam sirkulasi berarti ada 100 – 200 eosinofil di dalam jaringan.<sup>44</sup> Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Morokata T, dkk (2000) dimana BALB/c yang disensitisasi OVA dosis tinggi akan menyebabkan timbulnya sitokin  $T_H2$  yang ditandai dengan meningkatnya IL-4, IL-5 dan menurunnya  $IFN\gamma$  serta didapatkannya infiltrasi eosinofil di jaringan paru dalam jumlah tinggi.<sup>39</sup>

Pemberian EGCg 0,5 mg dan 2 mg /hari/oral pada kelompok P2 dan P3 ternyata berpengaruh dalam menurunkan jumlah eosinofil darah perifer. Hal tersebut bisa dijelaskan juga oleh penelitian Tomita M. dkk (2002) dimana *catechin* dan pigmen teh selain dapat menghambat produksi sitokin  $T_H1$  juga dapat menghambat produksi sitokin  $T_H2$ . IL-5 yang merupakan sitokin  $T_H2$  meskipun hanya sedikit mengandung NF- $\kappa$ B di promoternya ternyata juga menjadi target *catechin* yang menyebabkan dihambatnya ekspresi gen IL-5. Padahal seperti diketahui IL-5 merupakan sitokin yang bertanggung jawab terhadap pematangan dan aktivasi eosinofil. Dihambatnya IL-5 bisa berarti berkurangnya produksi eosinofil.<sup>28</sup>

Rerata jumlah eosinofil / 100 leukosit pada kelompok P2 dan P3 ditemukan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,024$ ). Hal tersebut membuktikan bahwa pemberian EGCg 2 mg/hari/oral (P3) berpengaruh banyak terhadap penurunan jumlah eosinofil / 100 leukosit di sirkulasi dibandingkan dengan pemberian EGCg 0,5 mg/hari/oral (P2). Hal tersebut diduga disebabkan pada pemberian EGCg 2 mg/ hari/ oral secara

signifikan dapat meningkatkan kadar EGCg dalam plasma jika dibandingkan dengan dosis yang lebih rendah (0,5 mg/hari/oral) sehingga EGCg dapat lebih lama lagi memodulasi respon imun ke arah  $T_H1$ . Hasil penelitian diatas dapat didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Matsunaga (2001) dan Oriss TB (1999), dimana pemberian EGCg terbukti meningkatkan produksi IL-12 dan IFN- $\gamma$  serta menurunkan produksi IL-10 pada kultur makrofag. Adanya IL-12 dan IFN- $\gamma$  yang menginduksi respon imun kearah  $T_H1$  dapat menekan eosinofilia dan produksi IgE pada mencit.<sup>11, 36</sup>

## BAB VI

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Simpulan

1. Pemberian *Epigallocatechin gallate* teh hijau menyebabkan kadar interferon gamma pada mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin bertendensi meningkat, hal tersebut bisa dilihat dari rerata kadar IFN- $\gamma$  kelompok diberi ovalbumin saja kadarnya 4,3 pg/ml, meningkat menjadi 4,6 pg/ml pada kelompok yang diberi ovalbumin + EGCg 0,5 mg dan meningkat lagi menjadi 6,1 pg/ml pada kelompok yang diberi ovalbumin + EGCg 2 mg, meskipun peningkatannya secara statistik tidak bermakna ( $p>0,05$ ).
2. Pemberian *Epigallocatechin gallate* teh hijau menyebabkan jumlah eosinofil /100 leukosit darah tepi mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin bertendensi menurun, hal tersebut bisa dilihat dari rerata jumlah eosinofil /100 leukosit kelompok yang diberi ovalbumin saja 3,6 / 100 leukosit, menurun menjadi 2,3 / 100 leukosit pada kelompok yang diberi ovalbumin + EGCg 0,5 mg dan menurun lagi menjadi 1,3/100 leukosit pada kelompok yang diberi ovalbumin + EGCg 2 mg, dan penurunannya secara statistik bermakna ( $p<0,05$ ).

#### 6.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemberian *Epigallocatechin gallate* teh hijau terhadap perubahan respon imun  $T_H2$

dominan ke arah  $T_H1$  dominan dengan memakai indikator pembanding yang lain. Misalnya IFN- $\gamma$  untuk melihat respon imun kearah  $T_H1$  dominan dan IL-4 untuk melihat respon imun ke arah  $T_H2$  dominan.

2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemberian *Epigallocatechin gallate* teh hijau terhadap peningkatan kadar interferon gamma dengan cara memperpanjang waktu pemberian suplementasi EGCg melihat keadaan  $T_H2$  dominan akibat sensitisasi ovalbumin bisa bertahan dalam waktu lama dan dosis EGCg yang diberikan belum mencapai dosis optimal yang diperbolehkan.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemberian *Epigallocatechin gallate* teh hijau dalam menurunkan respon alergi dengan menggunakan indikator-indikator alergi yang lain misalnya kadar IL-4, skin test pada telinga mencit, pemeriksaan kadar IgE mencit dan pemeriksaan sebum mastosit pada jaringan yang terpapar ovalbumin.

## BAB VII

### RINGKASAN

Teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan komponen aktifnya yang dikenal sebagai *catechin* atau polifenol memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan sebagai anti tumor, anti mikroba dan anti alergi. *Epigallocatechin gallate* (EGCg) merupakan jenis *catechin* yang paling besar jumlahnya di dalam daun teh hijau yaitu sekitar 59,04%.

Seperti diketahui saat ini prevalensi atopi yang merupakan predisposisi terjadinya alergi meningkat di seluruh dunia. Dan saat ini paradigma keseimbangan  $T_H1$ - $T_H2$  merupakan fokus penting dalam mempelajari imunologi terutama mengenai terjadinya alergi. Studi mengenai keseimbangan  $T_H1$ - $T_H2$  tersebut mempelajari peranan limfosit T beserta subsetnya. Dimana subset *clone* sel T dibagi menjadi dua, yaitu  $T_H1$  dan  $T_H2$ .  $T_H1$  yang teraktivasi akan memproduksi IL-12, IFN- $\gamma$  dan limfotoksin. Kebalikannya  $T_H2$  yang teraktivasi akan memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-10 dan tidak memproduksi IFN $\gamma$  dan IL-12 maupun limfotoksin.

Perkembangan sel T ke arah  $T_H2$  dominan tersebut ditandai dari meningkatnya IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13. IL-4 yang diproduksi  $T_H2$  akan bertindak sebagai sitokin yang menginduksi aktivasi dan diferensiasi sel B dan mampu menginduksi MHC II dan Fc $\epsilon$ RII yang diekspresikan sel B sehingga memacu produksi IgE yang banyak terjadi pada penderita alergi. IL-5 yang diproduksi  $T_H2$  akan merangsang pertumbuhan dan aktivasi faktor eosinofil yang bertanggung jawab terhadap terjadinya eosinofilia. Eosinofil dan sel  $T_H2$  merupakan sel inflamatori yang bertanggung jawab terhadap patogenesis terjadinya alergi pada penyakit asma, rinitis alergi, dan dermatitis atopi.

Ovalbumin sebagai bahan yang dapat merangsang pembentukan respon imun ke arah  $T_H2$  dominan, sering dipakai pada banyak penelitian untuk mengarahkan respon imun seluler ke arah  $T_H2$  dominan. Sensitisasi dengan ovalbumin secara intraperitoneal terbukti dapat merubah kecenderungan respon imun mencit ke arah  $T_H2$ .

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian *Epigallocatechin gallate* (EGCg)) teh hijau terhadap respon alergi ( $T_H2$  dominan) mencit BALB/c yang disensitisasi dengan ovalbumin secara intraperitoneal dilihat dari produksi interferon gamma dan jumlah eosinofil darah perifer.

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *The Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia UNDIP, Bioteknologi UNDIP dan PAU UGM.

Mencit jantan galur BALB/c, umur 6 minggu, sebanyak 24 ekor dibagi secara acak menjadi 4 kelompok dengan beda perlakuan. Kelompok 1 (Kontrol) tidak mendapat perlakuan apapun, Kelompok ke 2 (P1) diberi 100 ug OVA dalam 0,1 ml alum adjuvant i.p pada hari 1 dan 14, kelompok ke 3 diberi 100 ug OVA dalam 0,1 ml alum adjuvant i.p pada hari 1 dan 14 dan diberi EGCg 0,5 mg/hari/oral selama 28 hari dan kelompok ke 4 diberi 100 ug OVA dalam 0,1 ml alum adjuvant i.p pada hari 1 dan 14 dan diberi EGCg 2 mg/hari/oral selama 28 hari.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian EGCg meningkatkan kadar IFN- $\gamma$  pada mencit yang disensitisasi OVA meskipun tidak bermakna ( $p > 0,05$ ). Hal tersebut diduga terjadi oleh karena adanya berbagai macam sitokin yang dihasilkan oleh sel  $T_H2$  itu sendiri yang selain dapat memacu respon alergi seperti IL-4 dan IL-5 juga

dihasilkan IL-10 yang merupakan sitokin antagonis dari IFN- $\gamma$ . IL-10 akan menghambat produksi IL -12 oleh sel makrofag yang berguna untuk menstimulasi produksi IFN- $\gamma$  oleh sel T dan sel NK, akibatnya produksi IFN- $\gamma$  akan terhambat atau tidak maksimal.

EGCg dapat menurunkan jumlah eosinofil /100 leukosit di darah perifer mencit yang disensitisasi OVA secara bermakna ( $p < 0,001$ ). Dosis EGCg 2 mg/hari/oral (P3) secara bermakna ( $p < 0,001$ ) juga lebih banyak menurunkan jumlah eosinofil / 100 leukosit dibandingkan dosis EGCg 0,5 mg/hari/oral (P2). Hal tersebut diduga disebabkan pada pemberian EGCg 2 mg/hari/oral secara signifikan dapat meningkatkan kadar EGCg dalam plasma jika dibandingkan dengan dosis yang lebih rendah (0,5 mg/hari/oral) sehingga EGCg dapat lebih lama lagi memodulasi respon imun ke arah  $T_H1$ .

Simpulan dari hasil penelitian ini adalah pemberian *Epigallocatechin gallate* menyebabkan kadar IFN- $\gamma$  mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin meningkat tidak bermakna dan jumlah eosinofil /100 leukosit darah tepi mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin menurun bermakna.

Saran dari penelitian ini adalah diperlukannya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemberian EGCg terhadap perubahan respon imun  $T_H2$  dominan ke arah  $T_H1$  dominan dengan memakai indikator pembanding yang lain, perlunya dilakukan penambahan dosis dan durasi pemberian EGCg, serta perlunya diteliti pengaruh EGCg dalam menurunkan respon alergi dengan melihat indikator-indikator alergi yang lain misalnya kadar IL-4, skin test pada telinga mencit, pemeriksaan kadar IgE mencit dan pemeriksaan sebum mastosit pada jaringan yang terpapar ovalbumin.



## DAFTAR PUSTAKA

1. Weisburger JH. Second international scientific symposium on tea and human health : an introduction. *Proc.Soc. Exp. Biol. Med.* 1999,220: 193 – 94
2. Merken HM, Beecher GR. Measurement of Food Flafonoids by HPLC. *J. Agric. Food. Chem.* 2000, 48 :577-94.
3. Beecher GR, Warden AB, Merken HM. Analysis of Tea Polyphenols. *P.S.E.B.M.* 1999 VOL 220.
4. Katiyar SA, Challa TS. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alternations in IL-10 and IL-12 production. *Carciogenesis.* 1999, 20:2117 – 24.
5. Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta* .1993, 1147: 132 – 6.
6. Toda M, Okuba S, Hara Y, Shimamura T. Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Jpn. J. Bacteriol.* 1991, 46:839 – 44.
7. Yam TS, Shah JM, Hamilton-Miller T. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea component. *FEMS Micribiol. Lett.* 1997, 152: 169 – 74.
8. Ho CT, Chen Q, Shi H, Zhang KQ, and Rosen RT. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from varoius chinese teas. *Prev. Med.* 1992, 21: 520-3.

9. Shiozaki T, Sugiyama K. Effect of tea extract, catechin, and caffeine against type-I allergic reaction. . *Yakugaku Zasshi*. 1997 Jul; 112(7) : 448-54.
10. Nakagawa KS. Absorbption and distribution of tea catechin, (-) epigallocatechin-3-gallate in the rat. *J. nutr. Sci. vitaminol*. 43:679 – 84.
11. Matsunaga K, Klein TW. Legionelle pneumophila replication in macrophages inhibited by selective immunomodulatory effects on cytokine formation by epigallocatechin gallate, a major form of tea catechin. *J. Infection & immunity* 2001, 69 : 3947- 53
12. Ohmori Y, Ito M. Antiallergic constituents from oolong tea stem. *J. Biol. Pharm. Bull*. 1995 May ;18 (5) : 683-6.
13. Holgate ST, Church MK. *Allergy*. 2<sup>nd</sup> ed. London. Mosby International 2001 : 3-16
14. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et all. Two types murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokin activities and secreted protein. *J. Immunology*. 1986, 138 : 3688-94
15. Shinbara M, Kondo N, et all. Interferon gamma dan Interleukin-4 production of ovalbumin- stimulated lymphocytes in egg-sensitive children. *J. Annals of allergy, astma, & immunology*. 1996, 77: 60 – 6.
16. Roitt I. *Essential immunology*. 8<sup>th</sup> eds. Oxford.Blackwell Science Ltd. 1994 : 312 - 36
17. Galli SJ, Lantz CS. Allergy. In : Paul W.E. *Fundamental immunology*. 4<sup>th</sup> eds. New York. Lippincott-Raven.1999 :1127 – 66

18. Matthews AN, Friend DS, Zimmermann N. Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils. *Journal of Immunology* . 1998 : 6273-8
19. Sugimoto Y, Sanuki S. Ovalbumin in developing Chicken eggs migrates from egg white to embryonic organs while Changing its conformation and thermal stability. *J Biol Chem*. 1999, 16: 11030-37
20. Kang B, Kim KM., Kang CY. Oral tolerance by high dose OVA in Balb/ c mice is more pronounced and persistent in th2-mediated immune responses than Th1 responses. *J. Immunobiology* 1999, 200 : 264 - 76
21. Akiyama H, Teshima R, Sakushima JI. Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains mice. *Immunol Lett* 2001 Aug 1;78(1):1 – 5
22. Saloga J, Reinz H, Lack G. Development and transfer of immediate cutaneous hypersensitivity in mice exposed to aerosolized antigen. *J. Clin. Invest.* 1993 , 91:133 – 40.
23. Sakagami H, Takeda M. Stimulation by epigallocatechin gallate of interleukin 1 production by human peripheral blood mononuclear cell. *Anticancer Res.* 1995, 15: 971-4
24. Tachibana H, Sunada Y. Identification of methylated tea catechin as an inhibitor of degranulation in human basophilic KU812 cells. *J. Biosci Biotechnol Biochem* 2000 Feb; 64(2) : 452-4

25. Chow HH, et al. Phase I Pharmacokinetic Study of Tea Polyphenols Following Single-dose Administration of EGCG and Polyphenon E. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Jan;10(1):53-8.
26. Adityono. Efek Teh Hijau terhadap Daya Fagositosis Makrofag pada Mencit yang Diinokulasi *L. Monocytogenes*. Skripsi FK UNDIP, Juli 2000.
27. Johan A, Susilaningih N, Gunardi. Penelitian in vitro Efek Polifenol Teh Hijau terhadap Mekanisme Pertahanan Tubuh pada Mencit yang Diinokulasi *L. Monocytogenes*. Laporan Akhir Penelitian DCRG Proyek URGE 2000/2001.
28. Tomita M, Irwin KI, Zi-Jian X, Santoro TJ. Tea Pigments inhibit the production of type 1 (TH1) and type 2 (TH2) Helper T cell cytokines in CD4<sup>+</sup> T cells. *Phytother. Res.* 2002. 16, 36 - 42
29. Sano M., Suzuki M. Novel antiallergic catechin derivatives isolated from oolong tea. *J. Agric. Food. Chem* 1999 May; 47(5) : 1906-10.
30. Ewan P W. *ABC of allergies : Anaphylaxis*. BMJ 1998;316:1442-5
31. Janeway A.C., Travers P. *Immunobiology : The immune system in health and disease*. 5<sup>th</sup> eds. New York. Churchill livingstone 2001: 473-481
32. Romagnani S. The T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 paradigm. *Immunol Today* 1997 ; 18 : 263 -6.
33. Constant SL, Botomly K. Induction of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 sel T CD4<sup>+</sup>: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;15:297 -322
34. Finkelman FD, Urban JFJ, Beckmann MP. Regulation of murine in vivo IgG and IgE responses by monoclonal anti IL-4 receptor antibody. *Int Immunol* 1991;3 : 599 - 607

35. Noben TN, Kropf P. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4 deficient mice. *Science* 1996 ; 271: 987-90.
36. Oriss TB, McCarthy SA, Campana MA, Morel PA. Evidence of Positive Cross-Regulation on Th1 by Th2 and Antigen-Presenting Cells: Effects on Th1 Induced by IL-4 and IL-12 . *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 1999-2007
37. Foster PS. Allergic Networks regulating eosinophilia. *J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1999 ; 21:451-4
38. Indrawati, Hematologi Rutin, Buku Pegangan Kuliah Patologi Klinik I Jilid I, FK Undip, 2000 ; 13
39. Morokata T, Ishikawa J, Yamada T. Antigen dose defines T helper 1 and T helper 2 responses in the lungs of C57BL/6 and BALB/c mice independently of splenic responses. *Immunol Lett.* 2000 May, 72 (2) : 119 – 26.
40. Saloga J, Reinz H, Larsen GL. Increased airways responsiveness in mice depend on local challenge with antigen. *Am. J. Respir.Crit. Care Med.* 1994. 149: 65 – 70.
41. Bowman LM, Holt PG. Selective Enhancement of systemic Th1 immunity in immunologically immature rats with an orally administered bacterial Extract. *J. infection and Immunity*, June 2001 : 3719 – 27.
42. Gunawijaya FA. Penentuan LD-50 Ekstrak teh hijau pada mencit strain C3H. *Maj.Ilm.Fak Kedokter.USAKTI.* Oktober 1996, vol 15 (4)
43. Jansen DF, Rijcken B. The Relationship of Skin Test Positivity, High Serum Total IgE Levels, and Peripheral Blood Eosinophilia to Symptomatic and

Asymptomatic Airway Hyperresponsiveness . *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*,  
Volume 159, Number 3, 1999, 924-31

44. Irani C, Apter AJ. *Evaluation of Eosinophilia*. In : Grammer LC, *Patterson's Allergic Diseases*. 6<sup>th</sup> eds. Philadelphia : Lippincot Williams & Wilkins, 2002 :  
683 – 700
45. Alam R. *Eosinophil*. In : Altman LC, *Allergy in Primary Care*. 1<sup>st</sup> eds.  
Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000 : 14 – 24